

00562

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



FACULTAD DE QUIMICA

CARACTERIZACION CINETICA Y TERMODINAMICA
DE LA L- Y D-LACTATO DESHIDROGENASA
MITOCONDRIALES DE *Euglena gracilis*.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS
P R E S E N T A :
Q.F.B. RICARDO JASSO CHAVEZ



MEXICO, D. F.,

2000.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

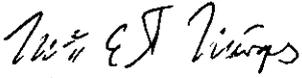
Jurado asignado:

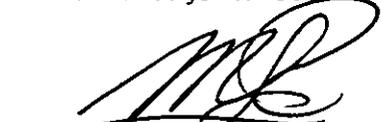
Presidente: Dra. Rosario A. Muñoz Clares
Secretario: Dra. Alicia Gonzalez Manjares
Vocal: Dr. José Edgardo Escamila Marván
1er. Suplente: Dr. Diego Gonzalez Halphen
2o. Suplente: Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

El tema se desarrolló en los Departamentos de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" y de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Este trabajo se realizó con los apoyos 25274-M y 25465-N de CONACYT.

Asesores del Tema:


Dra. Maria Eugenia Torres Márquez y


Dr. Rafael Moreno Sánchez.

Sustentante:


QFB. Ricardo Jasso Chávez.

**A mis papás Jovita y José, con todo mi corazón y agradecimiento,
por todo su amor, confianza y apoyo que siempre me han dado.
A ti mamita por todos tus cuidados y a ti papi por enseñarme el camino correcto.**

**A mis increíbles y sensacionales hermanos,
Araceli, Antonio y Alejandro, por ser mis mejores amigos,
por estar conmigo y ayudarme siempre en todo momento.**

A Porfirio, por su fidelidad.

**A mis lindos sobrinitos, Toñito, Dieguito y Pili.
A toda mi gran familia, A Pila y a Elena, a mis primos, tios y abuelos.**

**A Marcela, Cómo decirte todo lo que siento en tan poco espacio....
Gracias por estos sensacionales e increíbles primeros meses,
por tu amor, tu tiempo y atención.**

**Finalmente, mi agradecimiento a DIOS, por las mil formas en que me demuestra su
presencia.**

Dedicatorias.

A Raymundo, por tu amistad, aunque digas que no,
sé que en ti encuentro un amigo de verdad.

A mis amigos de la prehistoria: Mitzi, Adriana, Lariza, Quique,
Miguelito, Pablo y Carlos (el niñodonte), por enseñarme
que las cosas se logran si en verdad lo deseas.

A mis amigos y compañeros de-generación: Gabriel, Aliesha,
Norma (mi equipo), Gelonia, Ethel, Pablo (el bollo), Rox, Nere y sobrino, Lisbet (con Toño incluido),
Laura, Marco, Mayra, Diana, Gustavo, Marianita, Gina, Frida,
Catalán, a los Bollos FC y un largo etcétera, a todos mil gracias por esos grandes momentos.

A Noemí y a Martha por soportarme todos estos doce meses
y permitirme aprender de ellas.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, a Silvia, José Salud, César Avilés, César Sánchez, Oscar,
Adrián,
Fermín, Sara, Norma, David, Raúl, Paco, Noemí, Martha, Oralia, Don Javier, Fernando Ibarra, Fernando
Limonos y otro largo etcétera.

A Alice y Gerardo, gracias a todos por su amistad, compañerismo y su grandísima ayuda.

Quiero agradecer sinceramente a la Dra. Ma. Eugenia Torres y
al Dr. Rafael Moreno, por permitirme entrar a este maravilloso mundo
de la investigación, por la confianza que han depositado en mí
y porque gran parte de lo que ahora sé se lo debo a ellos.

Gracias a todo mi jurado por las valiosas críticas hechas a este trabajo.

Un agradecimiento especial a Leticia García, por tu incalculable ayuda,
porque siempre estás dispuesta a ayudarnos en cuanto trámite,
papeleo o problema que se nos presenta.

ÍNDICE.

	Página
INTRODUCCIÓN	
- Generalidades de la mitocondria	1
- Acarreadores de electrones de las cadenas respiratorias	
Nucleótidos de flavina.	2
Ubiquinona	3
Citocromos	4
Proteínas Fierro-azufre	6
- Proteínas transportadoras de electrones	8
Complejo I	10
Complejo II	12
Complejo III	13
Complejo IV	14
- Lactato deshidrogenasa independiente de piridin nucleótidos	
En procariontes	15
En eucariontes	20
En <i>Euglena gracilis</i>	21
ANTECEDENTES	32
HIPÓTESIS	33
OBJETIVOS	34
MÉTODOS	
- Cultivo y cosecha de <i>E. gracilis</i> .	35
- Preparación de las mitocondrias	35
- Determinación de proteína	36
- Determinación de la actividad de iLDH	36
- Efecto del pH	36
- Estudios termodinámicos de la iLDH	37
- Transporte de lactato a través de la mitocondria	37
- Extracción con detergentes	37
- Análisis de datos	38
RESULTADOS	41
- Efecto del pH	41
- Parámetros cinéticos	42
- Figura 1	43
Tabla 1	44
Figura 2	45
- Transporte de lactato a través de las mitocondrias	46
- Parámetros termodinámicos de la iLDH	47

Figura 3	48
- Efecto del oxamato y oxalato sobre la actividad de la iLDH	49
Figura 4	50
Tabla 2	51
Figura 5	52
Figura 6	53
Figura 7	54
Tabla 3	55
Figura 8	56
Figura 9	57
Figura 10	58
Tabla 4	59
- Efecto de la temperatura	55
Figura 11	61
Figura 12	62
Figura 13	63
Tabla 5	64
Figura 14	65
Figura 15	66
- Mecanismo cinético	67
Tabla 6	68
Figura 16	69
- Solubilización de las iLDH	67
Figura 17	70
DISCUSIÓN	71
CONCLUSIONES	86
PERSPECTIVAS	87
BIBLIOGRAFÍA	89

Abreviaturas.

BSAd	Albúmina de suero de bovino deslipidada.
CAT	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos.
Cd^{2+}	Ion cadmio.
cyt _c	Citocromo c soluble.
cyt _y	Citocromo c asociado a membrana.
DCPIP	Diclorofenolindofenol.
Ea	Energía de activación.
FAD	Adenín dinucleótido de flavina.
FMN	Mononucleótido de flavina.
iLDH	lactato deshidrogenasa independiente de piridín nucleótidos.
K^+	Ion potasio.
K_i	Constante de disociación del complejo enzima-inhibidor.
k_{inac}	Constante de velocidad de inactivación térmica.
K_m	Constante de Michaelis-Menten
K_s	Constante de disociación del complejo enzima-sustrato.
$(K_s)_{ap}$	Constante de disociación del complejo enzima-sustrato afectada por la presencia de un inhibidor competitivo (K_s aparente)
$(K_s/V_m)_{ap}$	Relación entre K_s y V_m afectadas por la presencia de un inhibidor.
MTT	Metasulfato de tetrazolio.
NADH/NAD ⁺	Nucleótido de adenina reducido/oxidado.
NADPH/NADP ⁺	Nucleótido de adenina-fosfato reducido/oxidado.
nLDH	Lactato deshidrogenasa dependiente de NADH/NAD ⁺ .
PMS	Metasulfato de fenazina.
Proteína Fe-S	Proteína Hierro-azufre.
Q1	Quinona con un grupo isoprenoide en la posición 5' del anillo.
$(V_m)_{ap}$	Velocidad máxima afectada por la presencia de un inhibidor.
V_m	Velocidad máxima

INTRODUCCIÓN.

El que la mitocondria contenga su propio DNA, ribosomas y RNAs de transferencia apoya la teoría del origen endosimbiótico. La teoría supone que los primeros organismos capaces de llevar a cabo un metabolismo aeróbico, incluyendo la producción de ATP dependiente de la respiración, fueron procariontes. Los eucariontes primitivos que vivían anaeróbicamente (por fermentación) adquirieron la capacidad de llevar a cabo la fosforilación oxidativa cuando establecieron una relación simbiótica con la bacteria viviendo en su citosol. Después de un proceso extenso en la evolución, que incluyó el movimiento de muchos genes bacterianos hacia el núcleo del eucarionte hospedero, la bacteria endosimbiótica eventualmente se convirtió en la mitocondria.

La teoría (Müller y col., 1999) presume que los procariontes primitivos de vida libre tenían la maquinaria enzimática para la fosforilación oxidativa, ya que sus descendientes los procariontes modernos tienen cadenas respiratorias muy similares a las de los eucariontes modernos. Los acarreadores de electrones bacterianos son similares a los de mitocondria, actúan en la misma secuencia y translocan protones hacia afuera a través la membrana plasmática concomitantemente con la transferencia de los electrones hacia el O_2 . Ciertos sistemas de transporte en bacterias se utilizan para la entrada extracelular de nutrientes en contra de un gradiente de concentración, en cotransporte con protones. La expulsión transmembranal de protones asociada a la respiración provee la fuerza motriz para la entrada de nutrientes. La rotación de los flagelos bacterianos es suministrada por turbinas de protones, que son motores moleculares soportados no por ATP sino por el

potencial electroquímico transmembranal generado por el bombeo de protones asociada a la respiración. Es muy probable que el mecanismo quimiosmótico haya evolucionado tempranamente en la evolución de los eucariontes.

Acarreadores de electrones de las cadenas respiratorias.

Todas las cadenas respiratorias consisten de una serie de acarreadores de electrones, los cuales son proteínas integrales de membrana, con grupos prostéticos capaces de aceptar o donar uno o dos electrones. Cada componente de la cadena puede aceptar electrones del acarreador precedente y transferirlos así al siguiente aceptor, en una secuencia específica. Hay cuatro tipos de transferencia de electrones en los sistemas biológicos: (a) transferencia directa de electrones, como en la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} ; (b) transferencia del electrón mas el protón como un átomo de hidrógeno; (c) transferencia como un ion hidruro ($:H^-$), el cual contiene dos electrones y (d) combinación directa de un reductor orgánico con el oxígeno. Se resumirá a continuación la información de nuestro mayor interés.

Nucleótidos de flavina. Las flavoproteínas contienen un nucleótido de flavina ya sea FMN o FAD y pueden estar unidos de forma covalente, como en algunas lactato deshidrogenasas independeintes de piridín nucleótidos (iLDH) de bacterias y levaduras (Futai, 1970; Markwell y Lascelles, 1978; Erwin y Gotschlich, 1993). Ambos nucleótidos de flavina cuando están oxidados pueden aceptar un electrón produciendo la forma de semiflavona (Daff y col., 1996) o dos produciendo $FMNH_2$ o $FADH_2$ (Figura I). El potencial de reducción estándar del FAD y FMN depende de la proteína con la cual esté asociada (Tabla I). El potencial redox estándar relevante es así, el de la flavoproteína en particular, no del FMN o FAD aislado y el

nucleótido de flavina puede ser considerado como parte del sitio activo de la flavoproteína.

Ya que las flavoproteínas pueden participar en una o dos transferencias de electrones, éstas pueden servir como intermediarios entre las reacciones en las cuales son donados dos electrones como en la NADH oxidasa de *Streptococcus faecalis* (Ahmed y Clairborne, 1992) y aquellas en las que sólo es aceptado un electrón.

Existen flavoproteínas que están asociadas a citocromos (flavocitocromos) y tienen actividad catalítica hacia diversos sustratos, tales como lactato y fumarato, reduciendo directamente al citocromo c (Daum y col., 1982; Morris y col., 1994).

La ubiquinona (también llamada coenzima Q) es una benzoquinona liposoluble con una cadena lateral isoprenoide. Existen moléculas semejantes a la coenzima Q, como la plastoquinona de cloroplastos y la menaquinona de bacterias (Ingledey y Poole, 1984; Tielens y van Hellemond, 1998). Así, la ubiquinona-9 y la rodoquinona existen en la poza de quinonas en las mitocondrias del protista *E. gracilis* (Buetow, 1989). Su función es la de acarrear los electrones en las cadenas asociadas a membranas, lo que hace factible las comparaciones de los datos obtenidos en mitocondrias con relación a los sistemas bacterianos. Las quinonas pueden aceptar un electrón para formar el radical semiquinona (UQH^{\bullet}) o dos electrones para formar ubiquinol (UQH_2) y, semejante a las flavoproteínas, éste es capaz de actuar entre un donador de dos electrones y un aceptor de un solo electrón (Fig. II). Ya que la ubiquinona es pequeña e hidrofóbica, es capaz de difundir libremente dentro de la bicapa lipídica de la membrana interna mitocondrial.

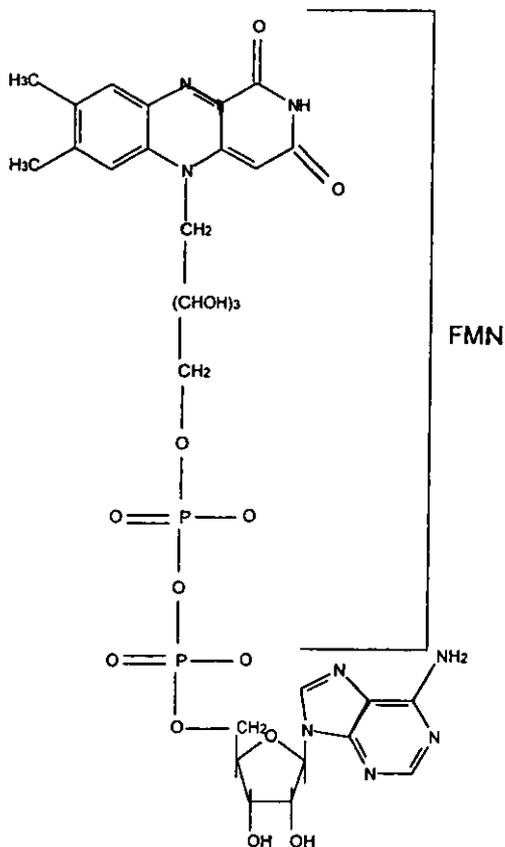


Figura I. Estructura química de los Nucleótidos de flavina.
Tomado de Lehninger, 1993.

Los citocromos son acarreadores de electrones, conectan a los componentes membranales de las cadenas fotosintéticas y respiratorias acarreadoras de electrones (Fig. III). Las porfirinas son la parte de los grupos hemo de los citocromos en donde se lleva a cabo la reacción redox, éstas tienen en su centro un átomo de fierro oxidado que se reduce durante la transferencia de electrones. Los grupos hemo de los citocromos *a* y *b* no se encuentran unidos covalentemente a sus

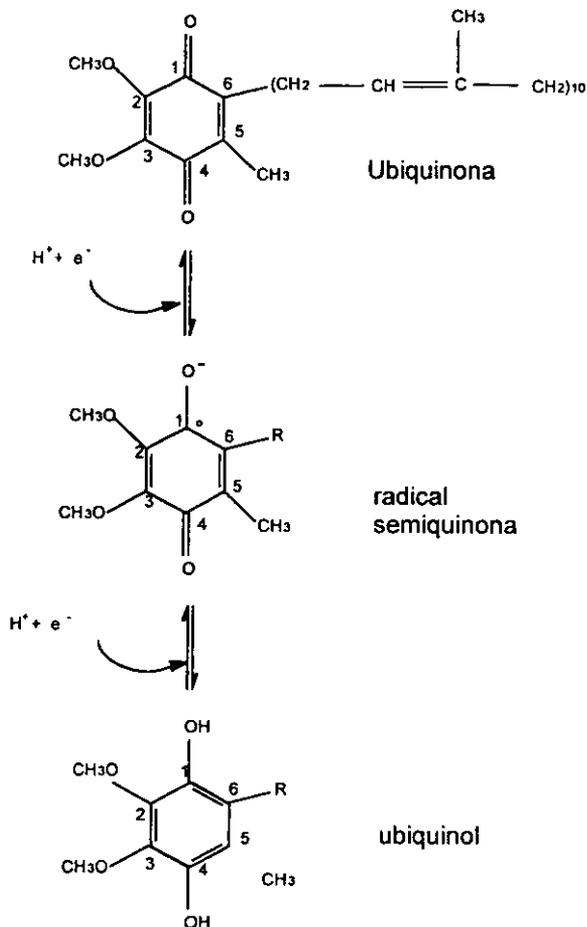


Figura II. Estructura química de la ubiquinona y sus diversos estados de Redox. Tomado de Lehninger, 1993.

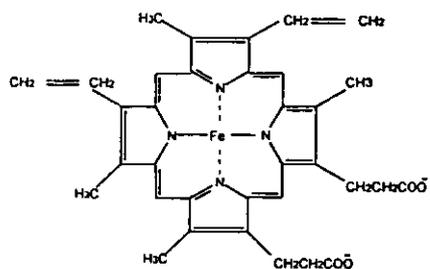
respectivas proteínas; no así los grupos hemo de los citocromos tipo *c* que se encuentran unidos covalentemente a través de residuos de cisteína. Los citocromos tienen también sitios de unión con las membranas que son esenciales para un transporte de electrones eficiente. Por ejemplo, el complejo *bc₁*, no es funcional cuando el citocromo *c₁* no tiene su carboxilo terminal, éste funciona en el anclaje a la membrana (Gennis, 1991). En *Rhodobacter capsulatus*, una bacteria

púrpura no azufrada, el citocromo soluble cyt c_2 y el citocromo asociado a la membrana cyt c_y son los únicos acarreadores de electrones que operan entre el centro de reacción fotoquímica del cloroplasto y el complejo bc_1 de la cadena acarreadora de electrones (Millykallio y col., 1998). El potencial de reducción estándar de los citocromos depende grandemente de su interacción con las cadenas laterales de la proteína (Tabla I). Los citocromos de tipo a , b y algunos c son proteínas integrales de membrana. Una excepción es el citocromo c de la mitocondria, una proteína soluble que se asocia a través de interacciones electrostáticas con la superficie externa de la membrana interna mitocondrial.

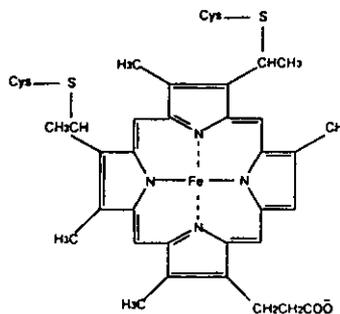
Los citocromos identificados en las mitocondrias de *E. gracilis*, tienen semejanzas con los citocromos presentes en mamíferos y en plantas superiores. Además de un citocromo tipo a y un citocromo soluble tipo c , se ha identificado un citocromo tipo b_{561} (Buetow, 1989).

En algunas proteínas transportadoras de electrones que contienen fierro, como en las proteínas **fierro-azufre**, el fierro no está presente en el grupo hemo sino en asociación con átomos inorgánicos de azufre y/o los átomos de azufre de residuos de cisteína de las proteínas. Los centros fierro-azufre (Fe-S) presentan diversas estructuras (Fig. IV), con un solo átomo de fierro coordinado a cuatro residuos de cisteína a través del azufre de sus cadenas laterales, como la ferredoxina hidrogenosomal de *Trichomonas vaginalis* con un centro [2Fe-2S] (Liu y Germanas, 1998), hasta centros Fe-S mas complejos con dos o cuatro átomos de fierro como las Ferredoxinas I y II de *Rhodobacter capsulatus* (Hallenbeck y Gennaro, 1998) y la piruvato-ferredoxina oxidoreductasa en *Desulfovibrio africanus* (Pieulle y col., 1995). Todas estas proteínas participan en la transferencia de un electrón, en

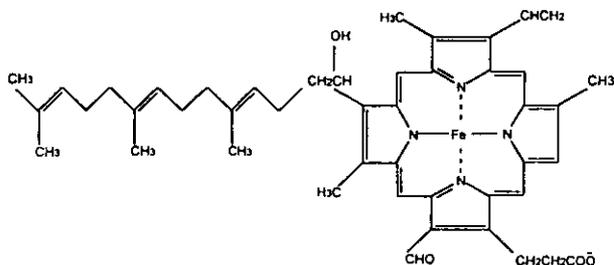
la cual uno de los átomos de hierro se oxida o se reduce (ver Tabla I).



Protoporfirina IX
(en citocromos tipo b).



Hemo c
(en citocromo c)



Hemo A
(en citocromos tipo a)

Figura III. Estructura química de algunas porfirinas presentes en los citocromos encargados del transporte de electrones. Tomado de Lenhinger, 1993.

Tabla I. Potenciales de reducción estándar de algunos acarreadores de electrones de la cadena respiratoria en algunos eucariontes y procariontes.

Organismo	Reacción Redox.	E' o (V)
<i>Tetrahymena pyriformis</i> ^a	hemo tipo b (Fe ³⁺) + e ⁻ → hemo tipo b (Fe ²⁺)	-0.04
<i>T. pyriformis</i>	cit tipo c (Fe ³⁺) + e ⁻ → cit tipo c (Fe ²⁺)	-0.17
<i>T. pyriformis</i>	cit a ₂ (Fe ³⁺) + e ⁻ → cit a ₂ (Fe ²⁺)	+0.245
<i>Azotobacter vinelandii</i>	FAD _(NiL) ^b + 2H ⁺ + e ⁻ → FADH ₂	-0.226
<i>Streptococcus faecalis</i> ^c	FAD _(NADH Oxidasa) + 2H ⁺ + e ⁻ → FADH ₂	-0.219
<i>Escherichia coli</i> ^f	FAD _(D-ILDH) + 2H ⁺ + e ⁻ → FADH ₂	-0.19
<i>E. coli</i>	FMN _(L-ILDH) + 2H ⁺ + e ⁻ → FMNH ₂	-0.19
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	FMN _(L-ILDH) ^c + 2H ⁺ + e ⁻ → FMNH	-0.135
<i>S. cerevisiae</i>	FMNH [*] _(L-ILDH) + 2H ⁺ + e ⁻ → FMNH ₂	-0.045
<i>S. cerevisiae</i>	cit c (Fe ³⁺) _(L-ILDH) + 2H ⁺ + e ⁻ → cit c (Fe ²⁺)	-0.003
<i>Shewenwilla putrefaciens</i>	FAD ^d _(Fumarato reductasa) + 2H ⁺ + e ⁻ → FADH ₂	-0.320
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i> ^g	[4Fe ³⁺ --4S] _(Ferredoxina) + e ⁻ → [4Fe ²⁺ --4S]	-0.410
Corazón de bovino ^h	FMN _(Complejo I) + 2H ⁺ + e ⁻ → FMNH [*]	-0.414
Corazón de bovino	FMNH [*] _(Complejo I) + 2H ⁺ + e ⁻ → FMNH ₂	-0.336
<i>Paracoccus denitrificans</i> ⁱ	cit a (Fe ³⁺) + 2H ⁺ + e ⁻ → cit a (Fe ²⁺)	-0.03
<i>P. denitrificans</i>	cit a ₃ (Fe ³⁺) + 2H ⁺ + e ⁻ → cit a ₃ (Fe ²⁺)	-0.22
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ^j	cit c ₂ (Fe ²⁺) + P ⁺ _(centro de reacción) + e ⁻ → P	+0.505

^a1er. componente, Kilpatrick y Erecinska, 1977; ^bProteína regulatoria de fijación de nitrógeno, Macheroux y col., 1998; ^cFlavocitocromo b₂, Tegoni y col., 1998; ^dFlavocitocromo c, Morris y col., 1994; ^eAhmed y Clairborne, 1992; ^fUden y Bongaerts, 1997; ^gSaeki y col., 1989; ^hSled y col., 1994; ⁱHellwig y col., 1999; ^jVenturoli y col., 1998.

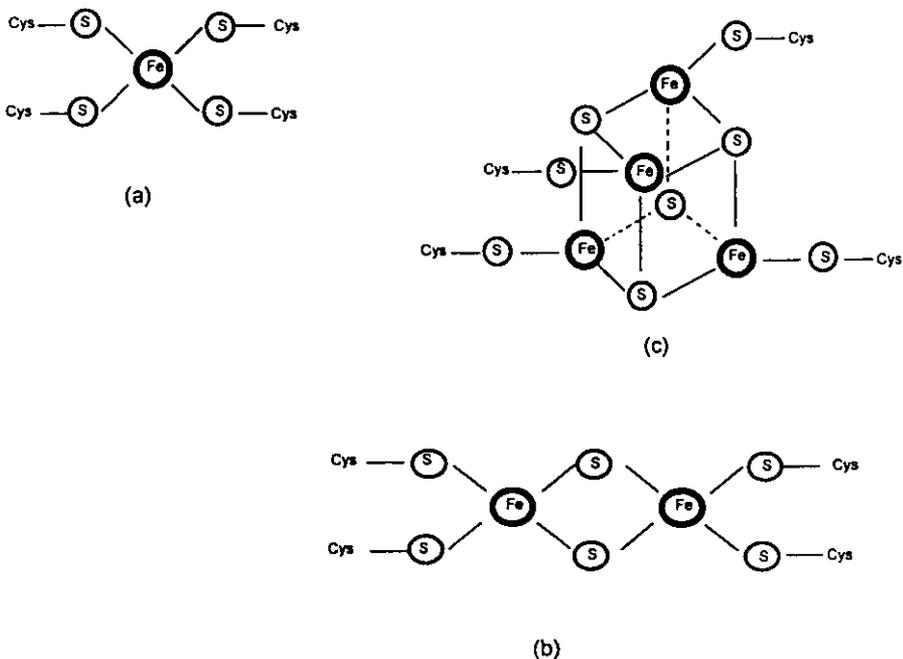


Figura IV. Estructuras químicas de los centros de las proteínas Fe-S. Pueden ser simples como en (a), con un solo ion Fe rodeado por átomos de S de cuatro residuos de cisteína. Otros centros incluyen tanto S inorgánicos como de residuos de cisteína, como en el 2Fe-2S (b) o 4Fe-4S (c). Tomado de Lenhinger, 1993.

Complejos transportadores de electrones.

A pesar de la complejidad de las cadenas respiratorias bacterianas, comparadas con las halladas en eucariontes, es posible hacer una generalización con respecto a los componentes básicos que conforman estos sistemas de transducción de energía. En eucariontes, la cadena respiratoria de la mitocondria puede oxidar diversos sustratos como el NADH, el glicerol-3-fosfato, el succinato, los ácidos grasos, etc., por medio de deshidrogenasas que a su vez son quinonas reductasas. En procariontes pueden oxidarse otros muchos sustratos, además de los arriba

mencionados, como formato, dihidroorotato, glicerol (Taylor y Zhulin, 1998) prolina, 6-fosfogluconato, L- y D-lactato (Ingledey y Poole, 1984), mandelato (Hoey y col., 1987), metanol (Yang y col., 1998) y piruvato (Pieulle y col., 1995); que en la mayoría de los casos reducen también a las quinonas. En levaduras sin embargo, existen deshidrogenasas que no ceden sus electrones directamente a la quinona; tales como las citocromo c oxidorreductasas, la L-lactato deshidrogenasa (Gondry y Lederer, 1996) y la L-mandelato deshidrogenasa (Illias y col., 1998) y, en algunas bacterias, las citocromo b oxidorreductasas, heterodisulfuro reductasa y la subunidad H2 de la hidrogenasa de *Methanosarcina mazei* (Brodersen y col., 1999). No obstante la gran variedad de deshidrogenasas presentes en los diversos organismos, la NADH deshidrogenasa y la succinato deshidrogenasa son las más abundantes en las cadenas respiratorias.

El complejo I, llamado también **NADH deshidrogenasa** de las mitocondrias de mamífero y de *Paracoccus denitrificans*, transfiere los electrones del NADH hacia la ubiquinona. Estos complejos contienen un arreglo similar de los centros Fe-S y catalizan la transferencia de electrones sensible a rotenona, del NADH a la ubiquinona. Esta transferencia de electrones está acoplada a la translocación transmembranal de protones. Sin embargo, mientras que la NADH deshidrogenasa aislada de mitocondrias consta de al menos 20 diferentes subunidades polipeptídicas, la de *Paracoccus* solo cuenta con algunas subunidades (Philip, 1987).

En 1993 se clonó el grupo de genes que codifican para las NADH-1 de *P. denitrificans*. Estas enzimas están asociadas con un sitio de acoplamiento de energía, funcionan como bombas de protones y al parecer son la contraparte del complejo I presente en mamíferos. Se secuenciaron 14 genes estructurales y se caracterizaron sus polipéptidos. Dentro de

éstos se han localizado cinco centros de Fe-S, dos de estos centros Fe-S tienen potenciales redox dependientes del pH, lo que sugiere que participan en el bombeo de protones. Además, se ha observado que al igual que en mamíferos, la transferencia de electrones de la NADH deshidrogenasa de *P. denitrificans*, es sensible a rotenona (la rotenona previene la transferencia de electrones de los centros Fe-S a la ubiquinona), a pesar de que carece de uno de los dos centros Fe-S; por lo que aún no se sabe si este centro Fe-S es un componente esencial de la NADH-1 de *P. denitrificans* (Yagi y col., 1993).

El complejo I se encuentra embebido en la membrana interna mitocondrial, con el sitio de enlace del NADH orientado hacia la matriz, para así poder captar a este producto de cualquiera de las deshidrogenasas que son abundantes allí. En las mitocondrias de mamífero, se han descrito los parámetros termodinámicos de las reacciones redox de flavina, es decir, de su estado reducido y de semiflavona. Se ha sugerido que hay un cambio conformacional en el complejo debido a la unión del ligando (Sled y col., 1994).

En los eucariontes que viven anaeróbicamente, el complejo I de la cadena transportadora de electrones, transfiere el NADH hacia la rodoquinona, a diferencia del complejo I clásico que utiliza a la ubiquinona. Estas quinonas, ubiquinona y rodoquinona, difieren en su estructura y en su potencial redox. A semejanza con la NADH deshidrogenasa de *E. coli*, durante la respiración aerobia, transfiere sus electrones a la ubiquinona, mientras que durante la respiración con fumarato los electrones del NADH son transferidos a la menaquinona (Tielens y van Hellemond, 1998).

El Complejo II o Succinato deshidrogenasa es la única enzima del ciclo del ácido cítrico que está enlazada a la membrana mitocondrial. Aunque es más pequeña y simple que el complejo I, contiene dos tipos de grupos prostéticos y al menos cuatro diferentes proteínas. Estructuralmente, la succinato deshidrogenasa comprende cuatro subunidades que no son idénticas: una subunidad A que contiene a la flavina, una subunidad B que contiene tres centros Fe-S y dos subunidades hidrofóbicas C y D que contienen citocromo *b*. Estas últimas son esenciales para la unión de las subunidades catalíticas a las membranas y para la interacción de los sitios catalíticos a las quinonas (Tielens y van Hellemond, 1998). El complejo II de *R. sphaeroides* contiene dos subunidades de masa molecular semejante a la subunidad grande y pequeña de la succinato deshidrogenasa de la mitocondria de corazón de bovino y de *Rhodospirillum rubrum*. El complejo II de *P. denitrificans* al igual que todos los anteriores, no está asociado con la translocación de protones y la conservación de la energía (Philip, 1987). Se cree que los electrones pasan del succinato al FAD, de aquí a los centros Fe-S y finalmente a la ubiquinona.

En cuanto a los inhibidores del Complejo II, se ha reportado que el K^+ produce una inhibición en la actividad de la succinato deshidrogenasa en mitocondrias de corazón de perro, la cual no afecta su K_m pero si su V_{max} . Se ha sugerido que la inhibición inducida por K^+ puede ser el resultado de una modificación conformacional estable que la hace más sensible a moduladores negativos como el oxaloacetato o la coenzima Q oxidada (Chávez y col., 1985). También se ha reportado que el Cd^{2+} afecta la respiración sostenida por succinato en mitocondrias de hígado de rata (Korotkov y col., 1998), sugiriendo una inhibición de la succinato deshidrogenasa por este metal.

En eucariontes, el complejo citocromo bc_1 o ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa, o también llamado **complejo III** es dimérico. En cada monómero existen tres subunidades que poseen cuatro centros redox: el hemo b_L y el hemo b_H , ambos localizados dentro de la subunidad del citocromo b , el citocromo c_1 y el centro fierro-azufre tipo Rieske. Estas son las tres subunidades indispensables para la reacción de oxido-reducción, ya que en procariontes son las únicas subunidades presentes, excepto en *R. sphaeroides*, en donde existe una cuarta subunidad sin grupos redox (Gennis y col., 1993).

La estructura cristalográfica del fragmento hidrosoluble indica el predominio de las estructuras de hoja β -plegada y muestra también, que el centro Fe-S forma la punta de la proteína con las histidinas que lo unen en el extremo. Las estructuras cristalográficas del complejo bc_1 de corazón de bovino y de pollo muestran tres diferentes posiciones del dominio hidrofílico de esta subunidad. En una de éstas se encuentra cercana al hemo b_L , en otra cercana al citocromo c_1 y en la tercera está en medio. El centro Fe-S de un monómero interactúa con los grupos redox del otro. El flujo de electrones entre el acarreador del par electrónico ubiquinona y los acarreadores de un electrón (citocromos b_{562} y b_{566} , c_1 y c) se realiza en una serie de reacciones llamadas el ciclo Q (Trumpower, 1990). Aunque el flujo de los electrones de este segmento de la cadena respiratoria es complicado, el efecto neto de la transferencia es simple, el ubiquinol es oxidado a ubiquinona y el citocromo c es reducido. Actualmente, se acepta que el complejo bc_1 genera una fuerza protón-motriz por un mecanismo conocido como el ciclo Q modificado, esta fuerza protón-motriz es utilizada para la síntesis de ATP.

El complejo bc_1 de las mitocondrias de mamífero es sensible a diversos inhibidores como el mixotiazol quien

asemeja una parte estructural de la ubiquinona y se une al citocromo *b*, la antimicina y el HQNO que bloquean la reducción de la quinona y la estigmatelina que se enlaza a la forma reducida de la proteína fierro-azufre, cambiando su potencial redox (Link y col., 1993). Sin embargo, en el protista *E. gracilis*, el complejo *bc*₁ es parcialmente resistente a mixotiazol en mitocondrias intactas y totalmente insensible a antimicina y HQNO cuando el complejo esta semi-purificado (Covián, 1999).

El Complejo IV, también llamado Citocromo *c* oxidasa es el complejo terminal de las cadenas respiratorias de las mitocondrias y de muchas bacterias. Éste cataliza la transferencia de electrones del citocromo *c*, via cuatro centros redox (dos hemos tipo *a* y dos átomos de cobre) al aceptor final, el O₂. En *P. denitrificans*, éste consiste de sólo dos subunidades polipeptídicas que corresponden en masa molecular a las dos subunidades más grandes presentes en mitocondrias, la cual contiene además de 5-10 subunidades (Philip, 1987).

Las citocromo *c* oxidasas tipo *aa*₃ de eucariontes y procariontes son miembros de una superfamilia hemo-cobre de oxidasas relacionadas estructuralmente. Esta superfamilia exhibe variaciones considerables en términos de los grupos hemo (*a*,*b*) o del sustrato oxidado (quinol o citocromo *c*) (Gennis y col., 1993). El complejo IV funciona como una bomba de protones que contribuye a la fuerza motriz protónica necesaria para llevar a cabo la síntesis de ATP (de Gier y col., 1994). La subunidad I contiene los residuos que ligan al citocromo *a* como al centro binuclear citocromo *a*₃-Cu_B en las oxidasas tipo *aa*₃. El citocromo *a*₃ es el componente donde se unen el CO y el cianuro que son inhibidores clásicos de la citocromo *c* oxidasa. El centro binuclear hemo/cobre es el

sitio donde el oxígeno es activado y reducido a agua. La subunidad II ha sido implicada en el enlazamiento del citocromo c y el lugar donde se encuentra el segundo Cu_A y, presumiblemente, está involucrado en la oxidación del citocromo c. Además, se ha sugerido que está involucrado en el bombeo de protones (Gennis y col., 1993).

Lactato deshidrogenasa independiente de piridín nucleótidos.

iLDH en procariontes.

En todos los organismos, el lactato/piruvato es el producto de la enzima lactato deshidrogenasa dependiente de piridín nucleótidos o NAD^+/NADH (nLDH), enzima que participa en la glucólisis anaerobia. Esta vía metabólica se piensa fue la que se encargó de suministrar la energía a los primeros microorganismos que vivieron en una atmósfera sin oxígeno. El lactato es un importante producto final de la fermentación de la glucosa y otros carbohidratos. Muchas especies de bacterias forman lactato, pero la proporción de carbohidrato que se degrada a lactato depende del tipo de carbohidrato utilizado, de las condiciones de crecimiento y de la vía metabólica utilizada. Las bacterias homofermentativas usan la vía de Embden-Meyerhof y en el paso final convierten el piruvato a lactato, reacción concomitante con la regeneración de NAD^+ a partir del NADH . Todas las bacterias ácido-lácticas tienen una gran cantidad de nLDH (Garvie, 1980). Las nLDH que se han estudiado son citosólicas y difieren entre sí con respecto a sus características cinéticas, movilidad electroforética y pH óptimos. Todas tienen una masa molecular relativa de 140 KDa y consisten de cuatro subunidades idénticas de 36 KDa cada una (Long y Kaplan, 1968).

Otro tipo de lactato deshidrogenasas, que no utiliza NAD/NADH como coenzima se encuentran en una gran variedad de

bacterias y se conocen como lactato deshidrogenasa independiente de piridín nucleótidos (iLDH). Éstas también convierten el lactato en piruvato y no hay evidencia de que la reacción opuesta ocurra *in vivo* o *in vitro*. En muchos casos el aceptor natural de electrones de estas iLDH es desconocido.

La existencia de iLDH así como algunas de sus características cinéticas se han reportado en numerosos sistemas bacterianos, todas son monoméricas y su cofactor puede ser FMN o FAD dependiendo del isómero que oxiden (Tabla II).

La D-iLDH de *E. coli* ha sido la más estudiada. Desde 1959 se demostró que *E. coli* tiene una D-iLDH y una L-iLDH, pero hasta 1973 la D-iLDH se purificó y se describieron algunas de sus propiedades (Futai, 1973). La cantidad de D-iLDH por célula permanece constante no importando la fuente de carbono en el medio, mientras que la L-iLDH es inducida bajo condiciones aeróbicas en presencia de lactato y está ausente en células crecidas en glucosa (Haugaard, 1959). Desde antes de su purificación, la D-iLDH de *E. coli* ya era estudiada debido a que el transporte de ciertos metabolitos como aminoácidos (Kaback y Milner, 1970) y azúcares, principalmente β -galactósidos, son dependientes de la actividad de esta enzima (Barnes y Kaback, 1970). Estos datos demostraron que el efecto del D-Lactato sobre el transporte de metabolitos no se ejerce por la producción de ATP, ya que las preparaciones membranales no llevan a cabo fosforilación oxidativa, a pesar de que los electrones son transferidos de la enzima al oxígeno vía la cadena transportadora de electrones (Short y Kaback, 1974). Short y Kaback (1974; 1975), reportaron velocidades de consumo de oxígeno acoplado a la oxidación de D-Lactato de 106-308 ng átomo de oxígeno/min/mg de proteína y además demostraron, por medio de

Tabla II. Características de algunas iLDH's bacterianas.

Organismo	Enzima	P.M. (kDa)	Aceptor de e ⁻ *	Km (mM)	Vm	Inhibidor	Ki (mM)
<i>Escherichia coli</i> ¹	D-iLDH (FAD)	74 ^a	DCPIP o MTT- PMS	1.4-2.2 ^c	-----	Oxamato. C Oxalato. C ^b	0.0033 0.0009
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ²	D-iLDH (FAD)	62.8	DCPIP-PMS	0.264	----	Oxalato. C Reactivos para -SH	----- -----
<i>Neisseria meningitidis</i> ³	D-iLDH	70	MTT-PMS	5.1	0.5 ^d	Oxamato. Piruvato.	----- -----
<i>N. meningitidis</i>	L-iLDH	----	MTT-PMS	14	0.06	-----	-----
<i>Megasphaera elsdenii</i> ⁴	D-iLDH (FAD)	55	----	-----	-----	Oxalato. D-lactato.	-----
<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i> ⁵	L-iLDH	107	DCPIP-PMS	0.5	-----	Oxamato. NC Oxalato. NC D-lactato. C	0.96 0.03 22
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ⁶	D-iLDH	-----	MTT-PMS	0.2	----	-----	-----
<i>Paracoccus denitrificans</i> ⁷	D-iLDH	54	DCPIP-PMS	0.81	-----	Tenoiltrifluo- roacetona. NC	2.2
<i>Selenomonas Ruminantium</i> ⁸	D-iLDH	----	DCPIP	0.5	----		
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ⁹	D-iLDH	55	DCPIP o MTT	3.5	13 ^d	-----	-----
<i>C. acetobutylicum</i>	L-iLDH	55	DCPIP o MTT	0.7	0.3 ^d	-----	-----

^aDeterminado por SDS-PAGE; ^bC, Inhibidor competitivo; NC, inhibidor no competitivo; ^clos valores fueron obtenidos en extractos crudos; ^dµmoles de MTT (Metasulfato de tetrazolio) o DCPIP (Diclorofenol-indofenol) reducido min⁻¹ mg prot⁻¹. ¹Kohn y Kaback, 1973; ²Allison y col., 1985; ³Erwin y Gotschlich, 1993; ⁴Olson y Massey, 1979; ⁵Markwell y Lascelles, 1978; ⁶Fischer y col., 1994; ⁷Zboril y Wernerová, 1996; ⁸Gilmour y col., 1994; ⁹Diez y col., 1997. * Aceptores artificiales empleados *in vitro*.

anticuerpos anti-D-iLDH que la enzima se encuentra en la parte interna de las preparaciones membranales.

Con respecto a las propiedades de la D-iLDH de *E. coli*, Ho y col. (1989) describen que la mayor actividad se obtiene en presencia de 0.6% de Tritón X-100 y que el pH óptimo de la enzima está entre 8.5-9.5, tanto en la enzima pura como en extractos crudos de cultivos de bacterias. La K_m para la actividad de la enzima pura va de 0.3 a 0.9 mM y en los extractos crudos se observa un valor de 1.4 a 2.2 mM. El L-lactato, metil DL-lactato y el α -hidroxibutirato también sirven como sustrato con valores de K_m altos y V_{max} menores que para el D-lactato. El oxalato, el oxamato, el ácido 2,3-difosfoglicérico y el α -metil-lactato pueden inhibir la reacción (Pratt y col., 1979).

El cofactor de la D-iLDH de *E. coli*, el FAD, se encuentra unido a la enzima en una relación de 1 mol/mol de enzima y no está unido de forma covalente.

La D-iLDH de *E. coli* también se ha utilizado en estudios de interacciones proteína-lípidos. La enzima pura presenta baja actividad en ausencia de detergente y lípidos; la actividad enzimática se incrementa cinco veces por acción del Tritón X-100 y por fosfolípidos de *E. coli* y 10 veces por lisolecitina. La preincubación de la enzima con lípidos por 10 minutos a 37°C incrementa la actividad aun más; la K_m de la enzima pura es la misma en solución acuosa y en presencia de Tritón X-100, pero se incrementa por adición de lípidos de *E. coli* o lisolecitina (Fung y col., 1979). Otros estudios sugirieron que en su estado nativo la enzima está rodeada predominantemente por fosfatidilglicerol o fosfatidil-serina, los cuales están presentes en baja cantidad en la membrana plasmática de *E. coli* (Kovatchev y col., 1981).

En 1984 se clonó el gen estructural para la D-iLDH de *E. coli* (Campbell y col., 1984). El marco de lectura abierta predijo que el polipéptido consiste de 571 aminoácidos (incluyendo el residuo de inicio metionina) con una masa relativa de 64.6 KDa. La

proteína no tiene baja polaridad ni segmentos hidrofóbicos inusuales; al parecer, contiene una pequeña repetición en la secuencia de aminoácidos, la cual es homóloga con la ya bien caracterizada L-LDH citosólica. Mutaciones específicas en esta enzima con incorporaciones de 5-fluorotriptofano indicaron en la estructura un posible sitio de enlace de la flavina en el carboxilo terminal de la enzima.

Las predicciones hechas a partir de los datos de resonancia magnética nuclear con ^{19}F y estudios de algunas deshidrogenasas citosólicas han mostrado dos regiones conservadas en estas enzimas; una es el dominio de unión al sustrato y la otra el dominio de unión al cofactor. En el caso de la D-iLDH, el dominio de unión al cofactor es de 200 aminoácidos y se encuentra hacia el carboxilo terminal; en el amino terminal se encuentra el dominio de unión al sustrato. Además, la D-iLDH parece tener una pequeña región necesaria para la fijación a la membrana y para acoplarse a acarreadores de electrones lipofílicos (Peersen y col., 1990). Estudios más recientes han permitido proponer un modelo esquemático de la cadena polipeptídica en la región de unión a la membrana de la D-iLDH de *E. coli*. En este modelo la región de unión a membrana está en una área que incluye a los aminoácidos Tyr228 y Phe369; la región que comprende estos aminoácidos no siempre está anclada a la membrana, sugiriendo que la D-iLDH se fija a la membrana por algunos elementos separados estructuralmente (Sun y col., 1993). En la tabla III se presenta la clasificación de algunas iLDH según su grupo prostético (flavina), su masa molecular y la localización celular que se ha descrito en bacterias y eucariontes. También se incluyen en la tabla III, algunas L- y D-mandelato deshidrogenasas cuyo sustrato es una molécula de lactato en la que el metilo está substituido por un fenilo (ácido α -hidroxifenilacético) (Fig V). Las mandelato deshidrogenasas poseen similitudes estructurales y fisicoquímicas que las hacen "parientes" cercanas a las iLDH's (Allison y col.,

1985; Hoey y col., 1987; Fewson y col., 1993). En bacterias, el mandelato es oxidado por la mandelato deshidrogenasa a fenilglioxilato que, por medio de la vía de la 3-oxoadipato y con la salida de succinato termina en la síntesis de acetil-CoA (Allison y col., 1985).

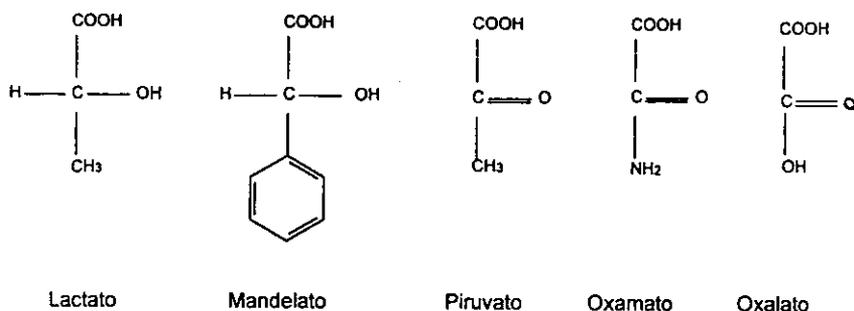


Fig V. Estructura química del lactato y mandelato, así como de moléculas con estructura similar utilizadas como inhibidores de las iLDH.

iLDH en eucariontes.

Las iLDH de algunos eucariontes, específicamente las de levaduras, varían significativamente de las encontradas en bacterias. Estas se localizan en el espacio intermembranal de la mitocondria. Las iLDH de levadura como las de *Saccharomyces cerevisiae* y *Hansenula anomala* (Daum y col., 1982; Chapman y col., 1991) son flavocitocromos b_2 . Fisiológicamente, tienen actividad de L-iLDH que transfiere los electrones directamente a un citocromo c , son tetrámeros idénticos cada uno consistente de dos diferentes dominios. El dominio del citocromo está en el amino terminal y se relaciona con el citocromo b_5 , mientras que el dominio que contiene FMN y la actividad de deshidrogenasa se encuentran hacia el carboxilo terminal. Esta enzima presenta una historia evolutiva diferente, con "parientes" detectadas en plantas, animales y bacterias; como la glicolato oxidasa peroxisomal de planta (Vолоkita y Somerville, 1987), la L-mandelato deshidrogenasa de *Pseudomonas putida*, la L-mandelato deshidrogenasa de *Rhodotorula*

graminis, la lactato mono-oxigenasa de *Mycobacterium smegmatis* y una gran variedad de 2-hidroxiácido deshidrogenasas de riñón de rata (Fewson y col., 1993; Illias y col., 1998) que oxidan 2-hidroxiácidos, pero con sustratos que difieren en tamaño, naturaleza química y papel metabólico. La gran similitud que guardan estas enzimas entre sí, se manifiesta en los experimentos de mutagénesis dirigida al sitio de unión al flavocitocromo b_2 de la enzima de *S. cerevisiae*, en los cuales una doble mutación de Ala-198 por glicina y leucina-230 por alanina, resultó en una enzima con una actividad de L-mandelato deshidrogenasa 400 veces mayor que la enzima nativa (Sinclair y col., 1998). *Sacharomyces cerevisiae* presenta además una D-iLDH; ésta se encuentra en la mitocondria, aunque no se sabe si está unida a la membrana. La enzima consta de un solo polipéptido y no presenta ninguna homología con la L-iLDH presente en el mismo organismo (Lodi y Ferrero, 1993). Cabe mencionar que al buscar mediante computadora alineamientos de secuencias de iLDH de bacterias y levaduras, no encontré regiones de similitud. Del mismo modo, al intentar los alineamientos entre L-iLDH y D-iLDH, tampoco encontré similitudes en la secuencia. Esto concuerda con lo que sugieren Taguchi y Ohta (1991), esto es: existe una familia de 2-hidroxiácido deshidrogenasas específicas para el isómero D. En la tabla III se presentan algunas características de las iLDH bacterianas y de levaduras.

iLDH en *Euglena gracilis*.

Se ha reportado que el protista *E. gracilis* tiene una actividad de D-iLDH, que se encuentra en la fracción particulada, es dependiente de zinc e independiente de piridín nucleótidos. El L-lactato también se oxida pero a velocidades más bajas (Price, 1961). La actividad enzimática se localiza en la mitocondria, la oxidación del lactato se lleva a cabo a velocidades muy altas y se encontró acoplada a la fosforilación oxidativa; los electrones de

Tabla III. Tipos de Lactato deshidrogenasa y su relación con algunas mandelato deshidrogenasas (MDH) y otras 2-hidroxiácido deshidrogenasas independientes de piridín nucleótidos.

Organismo	Enzima	Localización
Dependientes de FMN, Mr \approx 44000. Procariontes		
<i>Pseudomonas putida</i> ^a	L-MDH	Membranal
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ^b	L-MDH	Membranal
<i>A. calcoaceticus</i> ^c	L-LDH	Membranal
<i>Escherichia coli</i> ^d	L-LDH	Membranal
Dependientes de FMN (flavocitocromos), Mr \approx 59000. Eucariontes		
Espinaca ^e	Glicolato oxidasa	Mitocondria (soluble)
<i>Mycobacterium smegmatis</i> ^f	L-lactato monooxigenasa	Soluble?
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> ^g	L-LDH	Mitocondria (soluble)
<i>Rhodotorula graminis</i> ^h	L-MDH	Mitocondria (soluble)
<i>Hansenula anomala</i> ⁱ	L-LDH	Mitocondria (soluble)
Dependientes de FAD, Mr \approx 60000. Procariontes		
<i>A. calcoaceticus</i> ^j	D-LDH	Membranal
<i>A. calcoaceticus</i> ^k	D-MDH	Membranal
<i>E. coli</i> ^l	D-LDH	Membranal
<i>Paracoccus denitrificans</i> ^m	D-LDH	Membranal
<i>Megasphaera elsdenii</i> ⁿ	D-LDH	Membranal
Dependientes de FAD (flavocitocromos), Mr \approx 64040. Eucariontes		
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> ^o	D-LDH	membranal?

^aIllias y col., 1998; ^by^c; Allison y col., 1985a; 1985b; Fewson y col., 1993; ^dHaugaard, 1959; ^eVolokita y Somerville, 1987; ^fMu y col., 1994; Illias y col., 1998; ^gDaum y col., 1982; Fewson y col., 1993; Gondry y Lederer, 1996; ^hFewson y col., 1993; ⁱChapman y col., 1991; Fewson y col., 1993); ^jy^kAllison y col., 1985a; 1985b; Fewson y col., 1993; ^lFutai, 1973; Pratt y col., 1979; Garvie, 1980; Fewson y col., 1993; ^mZboril y Wernerová, 1996; ⁿOlson y Massey, 1979; ^oLodi y Ferrero, 1993.

la oxidación del D-lactato entran a la cadena transportadora de la mitocondria de Euglena al nivel de la ubiquinona. Además, la oxidación del L- y D-lactato presenta entre un 50-90% de resistencia a antimicina; por lo que, se propuso que la oxidación del lactato procede via una cadena transportadora de electrones alterna e independiente al citocromo bc₁ que es sensible a antimicina (Buetow, 1989; Moreno-Sánchez y col., 2000).

El que la actividad de iLDH presente en las mitocondrias de

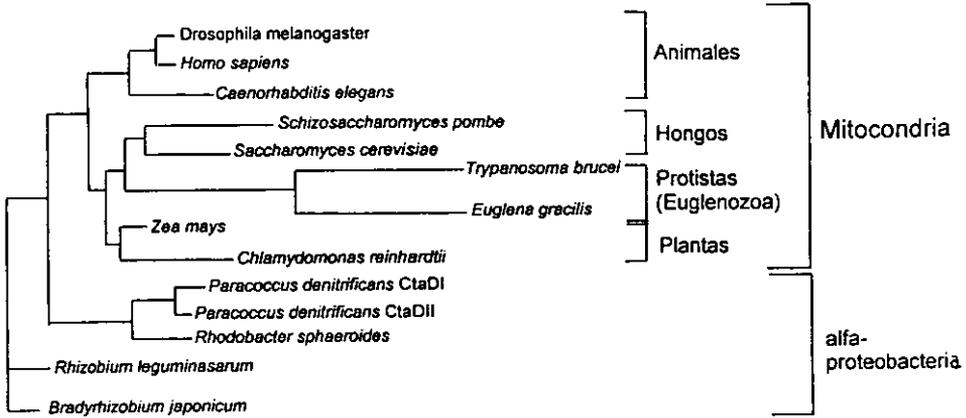
E. gracilis tenga como probable aceptor natural de electrones a una quinona, hace suponer que tiene cierta similitud con las enzimas encontradas en los sistemas bacterianos; además de que *E. gracilis* es de los eucariontes con mitocondrias más primitivos.

***Euglena gracilis* como modelo para el estudio evolutivo del metabolismo mitocondrial.**

Euglena gracilis es un organismo muy interesante por las características que comparte con animales y plantas superiores, además de las que son exclusivas de su grupo, como la de obtener energía por medio de la fermentación de ésteres de cera, acetato, succinato, glutamato-malato, glucosa e incluso etanol. En ambos casos varía la naturaleza de las moléculas orgánicas utilizadas y de los factores de crecimiento requeridos. Incluso, las diferentes cepas de *Euglena gracilis* se diferencian entre sí, ya que algunas tienen la capacidad de crecer en galactosa y otras no, tienen necesidades orgánicas diferenciales respecto de aminoácidos, purinas, pirimidinas y factores de crecimiento, según si se desarrollan heterotróficamente o fototróficamente y presentan una amplia capacidad biosintética, por lo cual necesitan incorporar además nutrientes inorgánicos (Buetow, 1989).

Como se dijo, los protozoarios más primitivos con mitocondrias se agrupan en el phylum Euglenozoa, que incluye familias como los kinetoplastidos (géneros *Trypanosoma*, *Crithidia* y *Leishmania*) y los euglénidos (*Euglena* y *Astasia*). La relación evolutiva entre los géneros *Euglena* y *Trypanosoma* se ha establecido por alineamientos de secuencias de cDNA que codifican la región para el factor de elongación-1 α (Nordnes y col., 1994) y por alineamientos de rRNA (Linton y col., 1999) entre otras. De mayor interés son el estudio del gen mitocondrial de la subunidad I de la citocromo oxidasa (COI) y el del gen nuclear de la proteína de choque térmico hsp60 (figura VI). Mismos que han

A



B

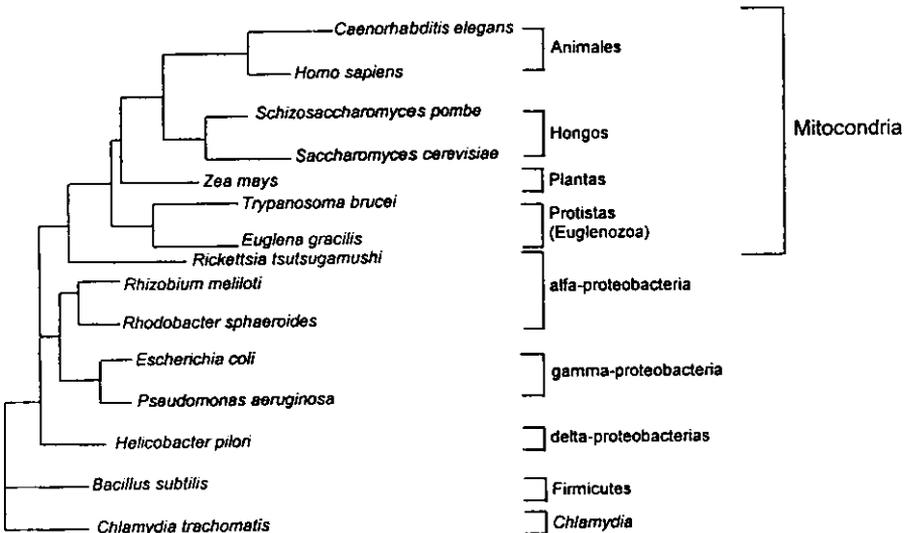


Figura VI. Reconstrucción filogenética de dos genes mitocondriales de algunos líneas eucarióticas, que dan evidencia de la cercanía entre *Euglena* y los tripanosomátidos. A, Árbol de la COI de archaeobacterias, protistas, plantas, hongos y animales. Las secuencias presentan mas del 50% de aminoácidos idénticos conservados (Tessier y col., 1997); B, Árbol de la Hsp60.

revelado una gran afinidad filogenética de la mitocondria de *E. gracilis* con los kinetoplástidos (Yasuhira y Simpson, 1997). Los generos *Euglena* y *Trypanosoma* están considerados en una de las primeras ramas de organismos con mitocondrias y los reportes sugieren que el genoma mitocondrial coexistió con el genoma nuclear desde que se estableció la primera simbiosis en los euglenoides; esto es, una bacteria en un eucarionte (Palmer y Delwiche, 1996). Las grandes similitudes genómicas y de la maquinaria para generar ATP entre la mitocondria y *Rickettsia prowazekii* indican claramente que el ancestro de la mitocondria fue una α -proteobacteria (Müller y col., 1999).

Las diferencias biológicas y metabólicas más notorias, sugieren, sin embargo, que el antecesor de vida libre de la mitocondria siguió otro camino y que las similitudes metabólicas reflejan una estrecha convergencia evolutiva (Müller y Martin, 1999).

Probablemente, el género *Euglena* no obtuvo directamente del primer evento endosimbiótico (procarionte/eucarionte) la maquinaria necesaria para llevar a cabo la fotosíntesis, como sí sucedió en plantas superiores. Al parecer la célula hospedera de este endosimbionte secundario (un eucarionte que engulle a otro eucarionte), tenía que ver con un protozooario que se cree evolucionó en paralelo con los tripanosomátidos (Palmer y Delwiche, 1996).

Metabolismo mitocondrial de *Euglena gracilis*.

Las mitocondrias de *E. gracilis* tienen aspectos metabólicos únicos o poco comunes con respecto a mitocondrias de otros organismos, como la utilización de ácido γ -aminobutírico en conexión con un ciclo de los ácidos tricarboxílicos modificado (CAT) y una vía para la

utilización de glicolato. En la mitocondria también se lleva a cabo la síntesis de paramilo, un glucano con enlaces β -1,3 que se utiliza no sólo como una reserva de energía sino también como una fuente directa de carbono en la síntesis de muchos constituyentes celulares (Buetow, 1989).

Una diferencia considerable en las mitocondrias de *Euglena* con respecto a eucariontes superiores es la ausencia de la piruvato deshidrogenasa; el piruvato producido por la glucólisis entra a la mitocondria y es transformado a acetil-CoA por la piruvato/NADP⁺ oxido reductasa (Inui, 1984). Esta enzima se inhibe fuertemente por el oxígeno y parece ser clave en la síntesis de ácidos grasos de la mitocondria bajo condiciones anaeróbicas; esto indica que en condiciones aeróbicas esta enzima se encuentra inactiva y no puede generarse acetil CoA a partir de piruvato para alimentar al CAT.

En las mitocondrias, tanto de animales como vegetales, el 2-oxoglutarato es convertido a succinato. La transformación de 2-oxoglutarato a succinil-CoA es catalizada por el complejo multienzimático de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa. El paso de succinil-CoA a succinato es catalizado por la succinil-CoA sintetasa (también llamada tiocinasa); en una reacción en la cual, la energía del enlace tioéster es conservada como energía química que se usará para fosforilar GDP en la mitocondria de animales o ADP en la mitocondria de plantas. En contraste, en la mitocondria de *E. gracilis* y como se observa en la figura VII, el 2-oxoglutarato es oxidado a succinato en dos reacciones, vía semialdehído succínico. La primera reacción es catalizada por la 2-oxoglutarato descarboxilasa la cual es dependiente de pirofosfato de tiamina, la reacción produce semialdehído succínico a partir del 2-oxoglutarato (Shigeoka y col., 1991). Existen dos semialdehído succínico deshidrogenasas,

una que usa NAD^+ y la otra usa NADP^+ , mismas que catalizan la conversión de semialdehído succínico a succinato y NADH(P) , pero sin la producción de GTP. Esta ruta de oxidación del 2-oxoglutarato a succinato explica por qué en mitocondrias intactas de *E. gracilis* el semialdehído succínico actúa como un buen sustrato respiratorio (Buetow, 1989).

En *E. gracilis* y en algas verdes, la primera enzima de la vía del glicolato es la glicolato deshidrogenasa, mientras que en las plantas la primera enzima es la glicolato oxidasa

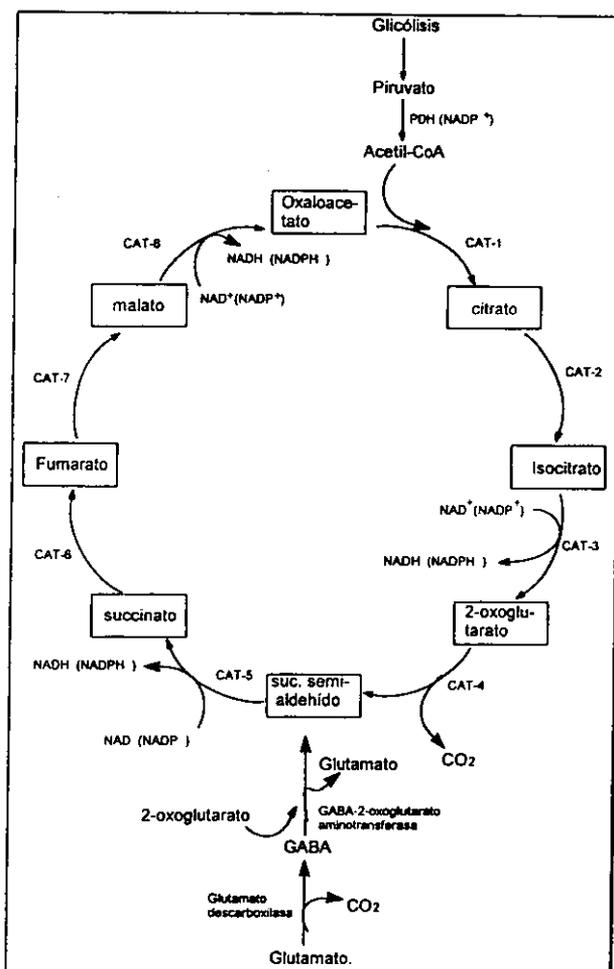


Figura VII. Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) asociado a la lanzadera de GABA (ácido γ -aminobutírico), la cual le provee de glutamato. Los pasos individuales son designados como CAT-1 al CAT-8. Las enzimas involucradas son: CAT-1, citrato sintasa; CAT-2, aconitasa; CAT-3, isocitrato deshidrogenasa específica para NAD^+ y NADP^+ ; CAT-4, 2-oxoglutarato descarboxilasa dependiente de TPP; CAT-5, semialdehído succínico deshidrogenasa específica para NAD^+ y NADP^+ ; CAT-6, succinato deshidrogenasa; CAT-7, fumarasa y CAT-8, malato deshidrogenasa unida a NAD^+ y probablemente a NADP^+ . Basado en Buetow, 1989.

(Buetow, 1989). En *Euglena gracilis* la enzima glicolato oxidoreductasa está asociada a la glutamato-glioxilato aminotransferasa y se encuentra tanto en cloroplastos y mitocondrias (Lord y Merret, 1971), como en microsomas (Yokota y Kitaoka, 1979). Aproximadamente el 25% del glioxilato formado por la glicolato deshidrogenasa es transaminado a glicina por otra enzima mitocondrial, glutamato-glioxilato amino-transferasa. El 75% de glioxilato remanente se metaboliza fuera de la mitocondria a CO₂ y formato (Yokota y Kitaoka, 1980). El metabolismo del glicolato es regulado por la disponibilidad de una fuente de nitrógeno como el sulfato de amonio y esta regulación ocurre en el paso de la oxidación del glicolato. *E. gracilis* puede usar el glicolato como una fuente de carbono para crecer en condiciones aeróbicas o anaeróbicas (Collins y Merret, 1974; Yokota y Kitaoka, 1980).

Cadena respiratoria y síntesis de ATP.

La organización de la cadena respiratoria de las mitocondrias de *E. gracilis* es compleja. El transporte electrónico mitocondrial vía citocromo oxidasa sensible a cianuro, es similar aparentemente al que se encuentra en mitocondrias de animales y plantas. Pero, a diferencia de las mitocondrias de mamífero, y a semejanza de las mitocondrias de plantas y de ciertos microorganismos, las mitocondrias de *E. gracilis* oxidan NADH externo y contienen una vía de transporte de electrones resistente a cianuro (Devars y col., 1992; 1998). Además, *Euglena* contiene vías adicionales para la oxidación de NADH, glicolato, glicina y lactato acopladas al bombeo de protones, lo cual se acopla a la producción de ATP. Dada la carencia de ciertos sistemas enzimáticos (principalmente la piruvato y 2-oxo-glutarato

deshidrogenasas) podría pensarse que la mitocondria de *E. gracilis* es deficiente en cuanto a la obtención de energía. Específicamente, el que la mitocondria de *Euglena* carezca de una piruvato deshidrogenasa activa en condiciones aeróbicas impide que el CAT se alimente de acetyl-CoA proveniente de piruvato de la glucólisis; por lo que la obtención de ATP a partir de sacáridos sería muy pequeña y la energía acumulada en el lactato formado no sería aprovechada totalmente por la célula.

Sin embargo, se ha reportado que las mitocondrias de *Euglena* oxidan D- y L-lactato a unas velocidades muy altas (Uribe y Moreno-Sánchez, 1992). Price (1961) fue el primero en obtener evidencia de la existencia de una lactato deshidrogenasa particulada en *Euglena*, independiente de piridín nucleótidos (iLDH) y que se encuentra acoplada a la fosforilación oxidativa. Esta actividad también se ha caracterizado en sistemas respiratorios bacterianos (Garvie, 1980). La iLDH tiene un importante papel en la obtención de energía, ya que esta enzima podría oxidar al lactato que se acumulara en condiciones aeróbicas por la carencia de una piruvato deshidrogenasa. El piruvato generado por esta oxidación probablemente sea utilizado para iniciar la gluconeogénesis o entrar a la vía del glicolato como hydroxipiruvato (Buetow, 1989). Además, se ha observado que la oxidación de D- y L-lactato está acoplada a la cadena respiratoria principal y que es parcialmente resistente a antimicina, lo que sugiere que esta enzima puede estar también acoplada a una vía alterna (Uribe y Moreno-Sánchez, 1992; Devars y col., 1998). Buetow, propuso que la oxidación de lactato procedía al nivel de quinona, en gran parte via una cadena transportadora de electrones alterna, la cual es independiente del complejo bc₁ (insensible a antimicina). La vía presenta también dos sitios de fosforilación; uno el

acoplado al flujo de electrones de los citocromos a y a₃ al oxígeno y, el otro, con un flujo de electrones del citocromo b al citocromo c, como ocurre en algunas levaduras (Daum y col., 1982; Chapman y col., 1991; Fewson y col., 1993; Lodi y Ferrero, 1993; Müh y col., 1994; Gondry y Lederer, 1996).

También se produce una pequeña oxidación de lactato por la vía insensible a cianuro que contiene una oxidasa alterna (como en plantas). Sin embargo, el propil-galato, un inhibidor de esta vía, sólo inhibe parcialmente el consumo de oxígeno en *Euglenas* cultivadas en lactato, lo cual indica que esta oxidasa alterna de *Euglena* presenta diferencias con respecto a la de plantas. Por ejemplo, la oxidasa alterna de *E. gracilis* al ser alimentada con lactato genera un potencial sensible a desacoplantes, suficiente para transportar calcio al interior de la mitocondria (Moreno-Sánchez y Raya, 1987); esta característica es semejante a la encontrada en *Paracoccus denitrificans*, cuya oxidasa terminal funciona como una bomba de protones (de Gier y col., 1994). En la figura VIII se muestra un esquema con las vías de transferencia de electrones presentes en *E. gracilis*.

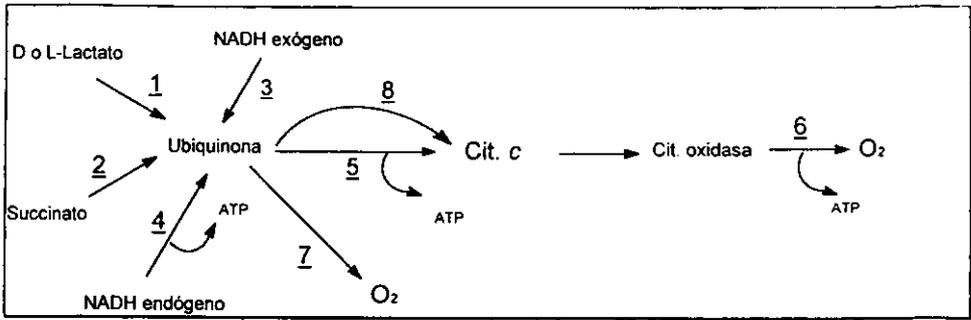


Figura VIII. Esquema postulado para las múltiples vías de transferencia de electrones en las mitocondrias de *E. gracilis*. 1, D o L-lactato deshidrogenasa independiente de piridín nucleótidos (iLDH). 2, succinato deshidrogenasa. 3, NADH deshidrogenasa insensible a rotenona. 4, NADH deshidrogenasa. 5, Complejo bc₁, (sensible a antimicina). 6, citocromo c oxidasa (sensible a cianuro). 7, oxidasa terminal resistente a cianuro (sensible a DPA, nPG, SHAM). 8, vía alterna fosforilante. Basado en Buetow (1989) y Moreno-Sánchez y col. (2000).

ANTECEDENTES.

La teoría endosimbiótica del origen evolutivo de las células eucarióticas postula que los organelos evolucionaron de procariontes de vida libre. Así, las mitocondrias han evolucionado de organismos que tienen semejanzas con las actuales bacterias aeróbicas. *E. gracilis* es un protista que se ha clasificado como uno de los primeros eucariontes con mitocondrias.

Lord y Merret (1971) estudiando a la glicolato oxido-reductasa, reportaron que los homogenados crudos de *Euglena* oxidaban de D-lactato y glicolato pero no de L-lactato, y que estas oxidaciones eran llevadas a cabo por distintas enzimas, a diferencia de muchas algas en las que una misma enzima puede oxidar ambos sustratos (Lord y col., 1971). La K_m para la actividad de D-iLDH en estos homogenados fue de 6.6 mM. Sin embargo, en estudios hechos sobre la distribución de la glicolato deshidrogenasa en mitocondrias y microsomas, Yokota y Kitaoka (1979) reportaron que había actividad de iLDH con ambos isómeros del lactato tanto en mitocondrias como en microsomas, ambas actividades resistentes a 1 mM de CN^- . En otros trabajos con mitocondrias de *E. gracilis* (Moreno-Sánchez y Raya, 1987; Uribe y Moreno-Sánchez, 1992; Devars y col., 1998) se describen actividades de iLDH con L- y D-lactato acopladas a la formación de un gradiente electroquímico suficiente para la entrada de calcio a la mitocondria y la síntesis de ATP. Sin embargo, en ningún trabajo de los antes mencionados se dan parámetros cinéticos de estas actividades, ni se describe si la actividad de iLDH se debe a una enzima con afinidad por ambos sustratos o si se trata de dos enzimas estereo-específicas. Recientemente, se describieron en mitocondrias de *E. gracilis* actividades de

iLDH para ambos isómeros del lactato, reportándose $K_{m(s)}$ de 0.5 y 0.7 mM y $V_{m(s)}$ de 55 y 318 ng átomo de O/min/mg prot. con L- y D-lactato respectivamente. Además, se reportó que en partículas submitocondriales las actividades son inhibidas por oxalato y oxamato (Uribe, 1998).

Ya que la oxidación de L- y D-lactato en las mitocondrias de *E. gracilis* se lleva a cabo a diferentes velocidades, que la actividad enzimática se encuentra unida a membranas y se acopla a la cadena respiratoria, además de ser semejante a otras muchas de sistemas bacterianos, planteamos la siguiente:

HIPÓTESIS

Las mitocondrias de *E. gracilis* poseen deshidrogenasas específicas los isómeros del ácido láctico.

OBJETIVOS.

Objetivo general:

Determinar las propiedades cinéticas de la iLDH de *Euglena gracilis*.

Objetivos particulares:

- a) Identificar la localización de la iLDH en la mitocondria.
- b) Determinar la naturaleza química del aceptor natural de electrones.
- c) Caracterización cinética y termodinámica de la(s) enzima(s) iLDH.
 - i) Determinar el mecanismo cinético de la enzima, su K_s para lactato, su V_{max} y el efecto de varios inhibidores (tipo de inhibición y K_i).
 - ii) Calcular los parámetros termodinámicos de la reacción catalizada por la(s) enzima(s).
- d) Determinar las constantes de velocidad de la inactivación térmica de la(s) enzima(s).

MÉTODOS.

Cultivo y cosecha de *E. gracilis*. Se utilizó la cepa de *E. gracilis* Klebs, originalmente obtenida en 1986 de la colección del departamento de Parasitología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN. Ésta cepa, tiene un tiempo generacional de 10-14 horas, tendencia a blanquear a 35°C e incapacidad para crecer con galactosa como única fuente de carbono. Estas características se relacionan con la cepa Z de *E. gracilis*. Las células se han cultivado en la oscuridad por varios años en un medio con glutamato y malato como fuente de carbono (Moreno-Sánchez y Raya, 1987). Estos cultivos se crecieron en matraces Erlen-Meyer de 1 litro a 25 ± 1°C, con agitación a 125 rev/min en la oscuridad. Las células se cosecharon en la fase logarítmica de crecimiento (3.5 días).

Preparación de las mitocondrias. Se prepararon como reportó Moreno-Sánchez y Raya (1987), con algunas modificaciones descritas de manera breve a continuación. Las células se cosecharon a los 3.5 días por centrifugación a 1000 x g por 10 minutos, se resuspendieron y se lavaron en un medio que contiene Sacarosa 250 mM, HEPES 10 mM y EGTA 0.5 mM a pH 7.3 (Medio SHE). Todos los procedimientos a partir de éste se realizaron a 4°C. El número celular se determinó por conteo en una cámara de Neubauer, inmovilizando a las células con la adición de HCl al 10%. Las células (2×10^9) se resuspendieron en 25 mL de medio SHE, con 0.4% (p/v) de albúmina de suero de bovino deslipidada (BSAd). Esta suspensión se sonicó en baño de hielo, a 18-20µ de amplitud (50-60% del máximo) con tres pulsos de 10 s cada uno e intervalos de 1 minuto entre cada

pulso con un sonicador Soniprep 150 (MSE Ltd, Crawley, Sussex). El diámetro del vástago del sonicador fue de 12 mm de diámetro. La suspensión se centrifugó a 1000 x g por 10 min. El botón se desechó y el sobrenadante se centrifugó a 7000 x g por 10 minutos. Las mitocondrias sedimentadas fueron resuspendidas en medio SHE e incubadas con ADP 1mM y BSAd al 0.5% por 10 minutos y posteriormente se centrifugaron a 7000 x g por 10 min. Las mitocondrias fueron resuspendidas en medio SHE BSAd al 0.2%.

Determinación de proteína. La proteína fue determinada por el método de biuret en presencia de 0.066% de desoxicolato de sodio, utilizando BSA como estándar. La preparación se centrifugó a 3500 r.p.m. por 10 min para eliminar la turbidez ocasionada por la presencia de paramilo.

Determinación de la actividad de iLDH. Las actividades de L-iLDH y D-iLDH fueron medidas espectrofotométricamente a una λ de 600 nm a 30°C en presencia de KCl 120mM, MOPS 20 mM y EGTA 1mM a pH 7.6 (Medio KME), metasulfato de fenazina (PMS) 0.20 mM, diclorofenol-indolfenol (DCPIP) 0.20 mM, como el aceptor artificial de electrones y con 30-50 μ g de proteína mitocondrial. La reacción se inició con la adición de L- o D-lactato. Cuando el aceptor de electrones fue Q1, las mitocondrias se incubaron con ADP 1 mM, Mg^{2+} 1mM y BSAd al 0.2% (p/v), a 25°C durante 15-20 minutos. El ensayo se llevó a cabo en presencia de 10 mM de azida a una λ de 273 nm.

Efecto del pH. Para obtener el pH óptimo se midió la actividad de iLDH con ambos isómeros a 30°C. El pH indicado se obtuvo con la mezcla de amortiguadores MES/Hepes/Tris a

una concentración de 10 mM para cada uno de ellos. Para los estudios de estabilidad de la iLDH, se incubaron las mitocondrias durante 5 min. a los valores de pH de 5 a 9 y se midió después la actividad a pH de 7.6 a 30°C. La intersección de la V_m aparente con la pendiente ($m=1$) de la figura 1B nos da el valor aproximado del pKa de los aminoácidos involucrados en la catálisis.

Estudios termodinámicos de la iLDH. Las actividades de iLDH se midieron con 100 μ g de proteína mitocondrial, con las concentraciones de L- y D-lactato a temperaturas de 20,25,30 y 35 °C.

Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la enzima. Se pre-incubaron de 50 a 100 μ g de proteína mitocondrial en presencia o en ausencia de los ligandos, a temperaturas entre 45-90 °C y tiempos entre 10 s y 15 min. Posteriormente la actividad de iLDH se midió a 30°C con L- ó D-lactato, según se indica en la figura.

Transporte de lactato a través de las mitocondrias. El transporte de lactato se realizó con base en la metodología utilizada por Wanders (1985). Brevemente, se incubaron 1.5-2 mg de proteína mitocondrial de *E. gracilis* en frascos de 25 mL, con 600 μ L de medio KME, [14 C]-L-lactato 1mM (60,000 cpm), y se incubaron a 25°C a diferentes tiempos, la muestra se colocó sobre una capa (300 μ L) de aceite de silicón con una densidad de 1.028 g/mL a 25°C que las separa de un volumen de 300 μ L de ácido perclórico al 30% (PCA), la reacción se paró por centrifugación a 14,000 r.p.m. en una centrífuga Eppendorff refrigerada a 4°C. Se colectó la fase del PCA o

acuosa y se midió la radioactividad en un contador de centelleo.

Extracción con detergentes. Se realizaron solubilizaciones con diversos detergentes tales como CHAPS, Octilglucósido, Lubrol, Tritón X-100, Tween 20 y Desoxicolato de sodio a diversas relaciones de detergente/proteína (x/7 mg de prot). Las muestras se colocaron en tubos Eppendorff y se agitaron durante 3 min. en baño de hielo en un Vortex (Daigger genie 2) a la potencia máxima. La muestra se centrifugó a 14,000 r.p.m. durante 2 min. en una centrifuga refrigerada Eppendorff, se separaron el sobrenadante y el precipitado y se midieron las actividades con L- y D-lactato como se describió previamente.

Análisis de datos.

Estudios termodinámicos. Se obtuvieron las K_s para los dos isómeros a cada temperatura y se graficaron las K_s vs $1/T$, de acuerdo a la ecuación:

$$-\log K_s = (\Delta H^\circ / 2.3R) \times (1/T) - (\Delta S^\circ / 2.3R)$$

donde ΔH° es la entalpia, ΔS° es la entropía, R es la constante de las gases y T es la temperatura absoluta.

Considerando condiciones de equilibrio rápido con los valores de K_s podemos obtener a partir de la pendiente el ΔH° y de la ordenada al origen el ΔS° .

Además con la siguiente ecuación:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S,$$

podemos calcular el ΔG° para la reacción de disociación del complejo enzima-sustrato (Segel, 1975).

Efecto de la temperatura. El logaritmo de las velocidades obtenidas a las diferentes temperaturas se graficaron vs tiempo, de acuerdo con la ecuación:

$$\log v = \log v_0 - (k_{inac} t / 2.303),$$

donde v_0 es la velocidad de la enzima sin incubación previa; k_{inac} es la constante de inactivación por calor y t , es el tiempo al cual se incubaron las mitocondrias.

De manera que a partir del valor de la pendiente se obtuviera la k_{inac} para cada temperatura.

Los valores de k_{inac} se graficaron entonces vs el inverso de la temperatura absoluta, para calcular la energía de activación de la desnaturalización por medio de un gráfico de Arrhenius, de acuerdo a la ecuación:

$$\log k_{inac} = -(E_a / 2.3R) (1/T) + \log v_0$$

donde E_a es la energía de activación para la desnaturalización.

Determinación de los parámetros cinéticos. Los parámetros cinéticos (K_m y V_m) se calcularon a partir de los gráficos de regresión no-lineal, editando la ecuación de Michaelis-Menten en el programa de cómputo Microcal Origin.

Los tipos de inhibición y los valores de K_i se calcularon a partir de los gráficos de Dixon-Webb, dobles recíprocos, ó editando las ecuaciones correspondientes en el programa de cómputo Microcal Origin para los tipos de inhibición competitivo, no competitivo y mixto, según se indique en la figura correspondiente.

Los mecanismos cinéticos de reacción se obtuvieron a partir de las gráficas de dobles recíprocos ó editando las ecuaciones para equilibrio rápido de los mecanismos cinéticos al azar, ordenado y ping-pong en el programa de cómputo Microcal Origin.

Las ecuaciones editadas que se utilizaron para el análisis de los datos, considerando condiciones de equilibrio rápido, fueron:

Michaelis-Menten:

$$v = V_m * S / K_s + S$$

Inhibición competitiva:

$$v = V_m * S / (K_s * (1 + (I / K_i)) + S$$

Inhibición no competitiva:

$$v = S * V_m / (1 + (I / K_i)) / K_s + S$$

Inhibición mixta:

$$v = S * V_m / (1 + (I / (\alpha * K_i)) / K_s * (1 + (I / K_i)) / (1 + (I / (\alpha * K_i)) + S$$

donde v es la velocidad, S es la concentración de sustrato, I es la concentración de inhibidor, K_s es la constante de disociación del complejo enzima-sustrato, K_i es la constante de inhibición, V_m es la velocidad máxima y α es el factor en la inhibición mixta que influye sobre la afinidad de la enzima por su sustrato.

Mecanismo cinético al azar:

$$v = V_m * A * B / \alpha K_A * K_B (\alpha K_A * B) + (\alpha K_B * A) + (A * B)$$

Mecanismo ordenado:

$$v = V_m * (A * B) / K_A * K_B + (K_B * A) + (A * B)$$

Mecanismo ping-pong (doble desplazamiento)

$$v = V_m * A * B / (K_B * A) + (K_A * B) + (A * B)$$

Análisis estadístico.

Todos los análisis estadísticos se hicieron con muestras independientes, a menos que se indique lo contrario, utilizando la prueba de t de student.

RESULTADOS.

Las mitocondrias de *E. gracilis* son capaces de oxidar a los dos isómeros del lactato por medio de una iLDH, al igual que lo hacen algunos sistemas bacterianos ya descritos anteriormente. En esta tesis investigamos mediante estudios cinéticos y termodinámicos si la oxidación del lactato se lleva a cabo por una iLDH inespecífica que oxide L- y D-lactato, o bien, si existen de enzimas estero-específicas.

Para lograr este objetivo se aislaron las mitocondrias intactas, las cuales se obtuvieron por sonicación de las células y posterior centrifugación diferencial. Las mitocondrias con L-lactato 10 mM como sustrato tuvieron un consumo de oxígeno en el estado 3 de 177 ± 21 ng átomo de oxígeno/min/mg proteína, el consumo de oxígeno estuvo acoplado a la síntesis de ATP (205.5 ± 11 nmol/min/mg prot), el ADP/O fue de 1.07 ± 0.1 y con un control respiratorio de 2 ± 0.1 , con una n=14 (Moreno-Sánchez y col., 2000).

Efecto del pH. Para obtener el intervalo de pH para una actividad óptima en la oxidación del lactato, así como para determinar una posible diferencia en la oxidación de los dos isómeros, medimos la actividad de iLDH en las mitocondrias intactas a diferentes valores de pH. Observamos que no importando el valor de pH la actividad con D-lactato siempre es mayor que la actividad con L-lactato. Con estos valores se determinó que la D-iLDH tiene una actividad máxima en un intervalo de pH entre 6.6 y 7.8, con un ligero aumento a pH de 7.3. La L-iLDH tiene un intervalo de pH óptimo entre 6.8 y 7.6, con un aparente máximo a pH de 7.3, por lo que todos los

experimentos posteriores se hicieron a un pH entre 7.3 y 7.6 (Figura 1).

Se hicieron también estudios de estabilidad de la iLDH pre-incubando a las mitocondrias a diferentes pH's durante 5 minutos y midiendo la actividad a pH de 7.6. Como se observa en la Figura 1 (líneas puntuadas) las actividades de L- y D-iLDH disminuyeron cuando las mitocondrias se pre-incubaron a valores de pH entre 5 y 7.3, y fueron estables a pH's entre 7 y 8. A valores mas altos (de pH 8 a 9) la actividad de D-iLDH empezó a decaer nuevamente mientras que la estabilidad de la L-iLDH se mantuvo ya que la actividad fue mayor con respecto a la que se midió a esos pH's sin incubación previa.

Parámetros cinéticos.

Oxidación del lactato. La oxidación de los dos isómeros del lactato presenta una cinética de tipo michaeliano, con una afinidad (K_s) similar. Sin embargo, la velocidad máxima siempre es mayor con D-lactato (Fig. 2A y Tabla 1).

Aceptores de electrones de la iLDH. En los sistemas bacterianos en los cuales se han descrito actividades de iLDH se ha reportado que el DCPIP es el aceptor de electrones mejor utilizado (Garvie, 1980). Las cinéticas que se realizaron a concentraciones variables de DCPIP con concentraciones saturantes de L- o D-lactato en las mitocondrias de *E. gracilis*, demuestran que la afinidad por el DCPIP es similar en la oxidación del L- y D-lactato (Fig. 2B y Tabla 1). Se observa también una inhibición por DCPIP a concentraciones arriba de 180-200 μ M.

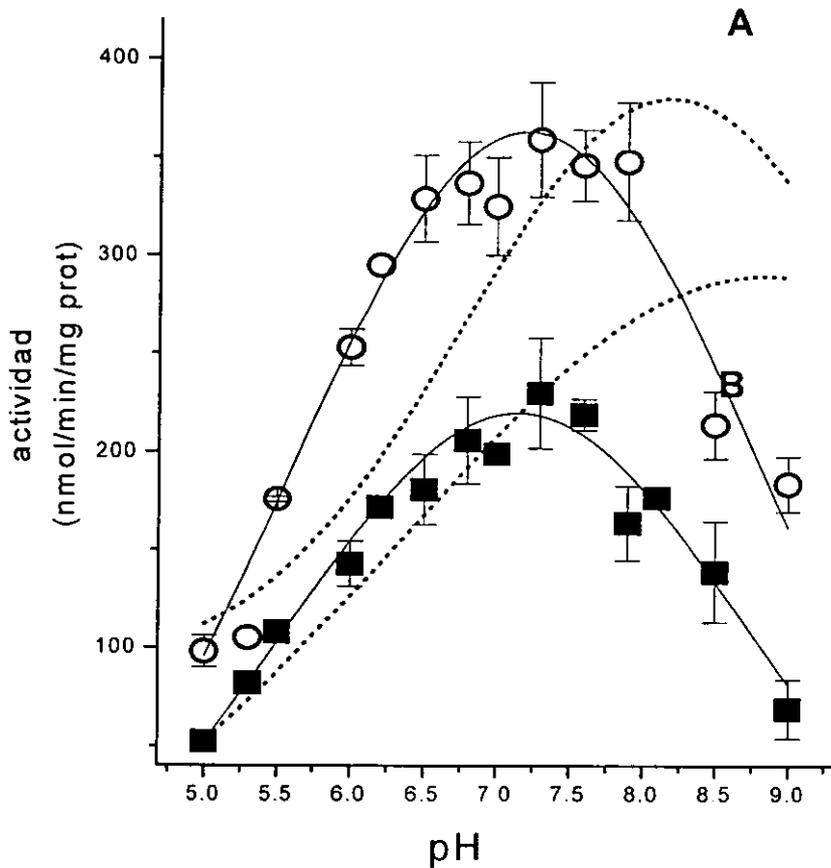


Figura 1. Efecto del pH. Actividad de la deshidrogenación de L-lactato (■) y de D-lactato (○) a diferentes valores de pH. Las líneas punteadas representan la actividad enzimática a pH de 7.6 después de pre-incubarse durante 5 minutos a los valores de pH indicados.

Tabla 1. Parámetros cinéticos obtenidos de la oxidación del L- y D-lactato en las mitocondrias de *E. gracilis*. La temperatura de los ensayos fue 30°C y el pH de 7.6, condiciones que se mantendrán constantes a menos que se indique lo contrario. Los valores indican el promedio \pm error estándar. El número entre paréntesis es el número de experimentos.

	L-lactato	D-lactato
K_m (mM)	2.6 \pm 0.5 (3)	2.8 \pm 0.3 (4)
V_m (nmol DCPIP _{red} /min/mg prot)	283 \pm 19 (3)	417 \pm 23 * (4)
K_m DCPIP (μ M)	21 (2)	18 (2)
K_m Q1 (μ M)	26 \pm 8 (3)	23 \pm 2 (3)
V_m (nmol Q1 _{red} /min/mg prot)	795 \pm 192 (3)	1618 \pm 306 (3)
* D-Lac vs L-Lac P<0.05		

Se ha reportado para algunas bacterias que las iLDH's que están unidas a la membrana forman parte de la cadena transportadora de electrones y tienen como aceptor natural de electrones a la poza de quinonas disponible en la cadena respiratoria (Ingledew y Poole, 1984). En las mitocondrias de *E. gracilis* se ensayaron también diferentes tipos de quinonas como aceptores de electrones como la Q1, que presenta un grupo isoprenoide de cinco carbonos en la posición 5 del anillo de la quinona, la Q2 que tiene dos grupos isoprenoides en la misma posición 5 y la DBQ (decilbenzoquinona) que tiene un grupo de diez carbonos alifáticos en la posición 5 del anillo de quinona. Las quinonas mas hidrofóbicas (Q2 y DBQ) no fueron buenos aceptores de electrones en la oxidación de los dos isómeros del lactato, mientras que la Q1 si lo fue. Las cinéticas realizadas variando la concentración de Q1, indican que hay afinidades similares a la iLDH por este

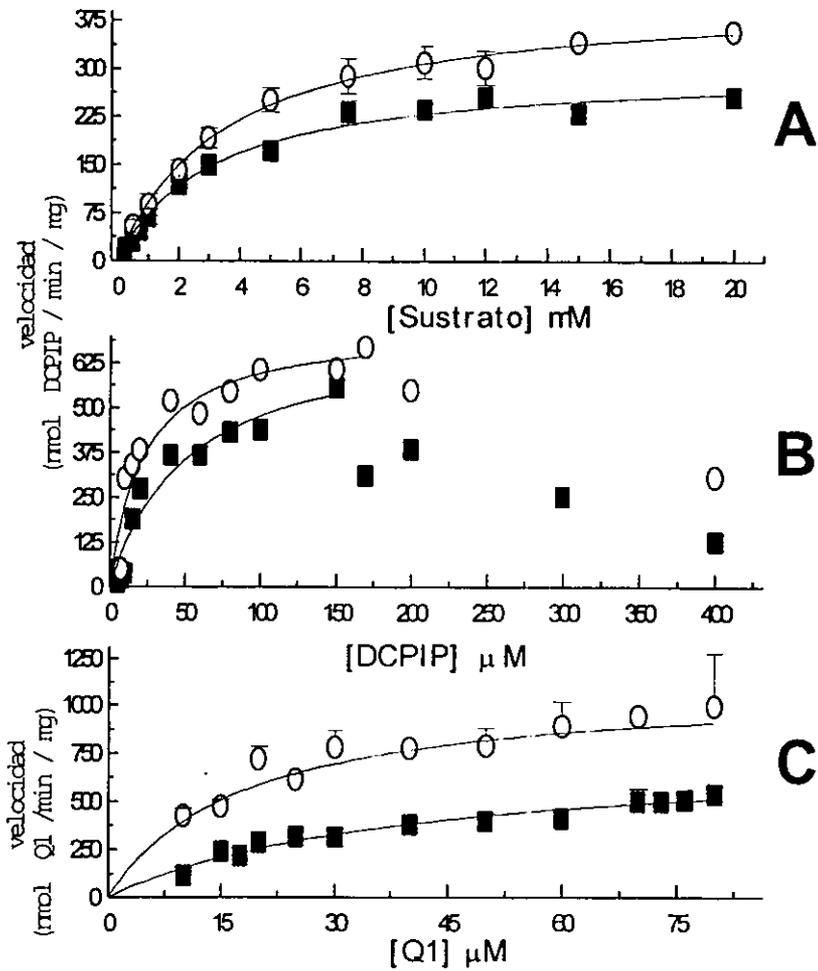


Figura 2. Cinética de la deshidrogenación del lactato en las mitocondrias de *E. gracilis*. (A) de L- y D-lactato. (B) Reducción del DCPIP y (C) Reducción de Q1. Las cinéticas de los aceptores de electrones se hicieron a concentraciones de L-lactato 20 mM (■) ó D-lactato 20 mM (○). La gráfica es el promedio de 3 experimentos \pm error estándar.

aceptor de electrones a concentraciones saturantes de ambos isómeros. Sin embargo, al igual que con DCPIP, la mayor velocidad se obtiene con D-lactato (Figura 2C).

Transporte de lactato a través de las mitocondrias.

Una pregunta a contestar fue si el lactato necesitaba entrar a la mitocondria para ser oxidado, ya que pudiera ser que el transporte del lactato fuera más lento que su deshidrogenación y la velocidad de deshidrogenación medida estuviese limitada por la actividad del transportador.

Para resolver este problema se midió el transporte de [14 C]-L-lactato a través de las mitocondrias de *E. gracilis*. Esto básicamente consistió en incubar a diversos tiempos las mitocondrias en presencia de [14 C]-L-lactato, éstas se filtraron a través de una capa de silicón, la cual permite sólo el paso de las mitocondrias intactas hacia una fase acuosa con ácido perclórico al 30% en donde las mitocondrias liberan el lactato internalizado (Wanders, 1985).

La figura 3A muestra el transporte de lactato hacia la mitocondria. Debido a que no se pudieron ensayar tiempos menores, se partió de los 20 segundos para las incubaciones. Se observa, a pesar de la dispersión debida a la variación que se obtiene en la integridad mitocondrial para cada preparación, que este transporte es casi lineal hasta los 30 segundos de incubación.

Se determinó el efecto de algunos inhibidores tanto de la iLDH, el oxamato y el oxalato, como el de algunos transportadores de metabolitos. Entre ellos el mersalyl, la N-etilmaleimida, el α -ciano-4-hidroxicinamato, que inhiben el transporte de piruvato, fosfatos, dicarboxilatos, etc. También se utilizó un inhibidor de la síntesis de ATP, la

estigmatelina, que inhibe al complejo bc_1 . Se utilizaron también moléculas que puedan competir con el transporte tanto del L-lactato como del D-lactato.

La figura 3B muestra que de todos los inhibidores utilizados, sólo el mersalyl inhibió significativamente el transporte de lactato a través de las mitocondrias (29%). El resto de los inhibidores disminuyeron el transporte entre 10 y 18%.

En la figura 3C se muestran las actividades de L-iLDH en presencia de los mismos inhibidores utilizados en el experimento del transporte. Se determinó que el oxalato y el oxamato, a concentraciones de 2 y 3 mM, inhibieron la actividad significativamente, 86% y 46% respectivamente. Sin embargo, los inhibidores del transporte de metabolitos y la estigmatelina no tuvieron efecto alguno sobre la actividad de deshidrogenasa.

Parámetros termodinámicos de la iLDH.

El cambio en la energía libre estándar de una reacción puede expresarse por la ecuación:

$$\Delta G^{\circ} = -2.3RT \log K_s$$

y también por la ecuación:

$$\Delta G^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T\Delta S^{\circ},$$

donde ΔH° es el cambio de la entalpía estándar (energía interna de un sistema), ΔS° es el cambio de la entropía estándar, y R es la constante de los gases ($1.987 \text{ cal} \times \text{mol}^{-1} \times \text{K}^{-1}$). Combinando ambas ecuaciones tenemos que:

$$\log K_s = -(\Delta H^{\circ}/2.3R)(1/T) + (\Delta S^{\circ}/2.3R).$$

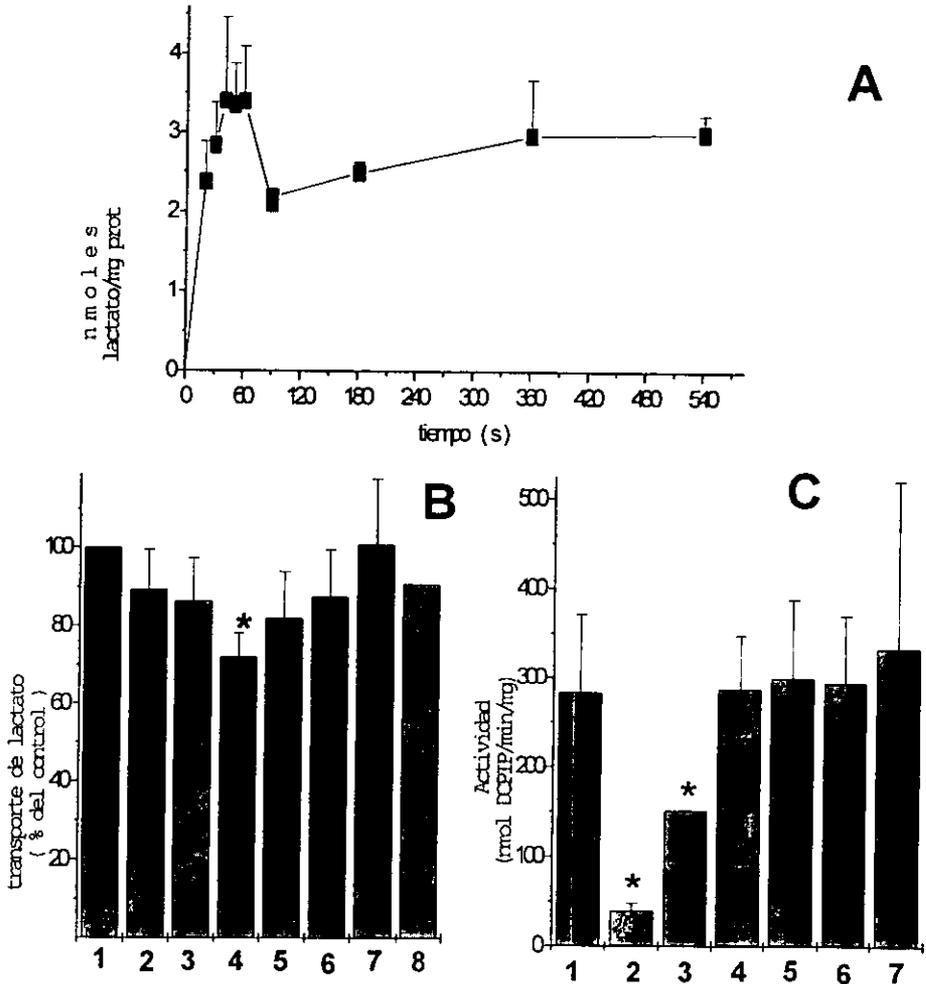


Figura 3. Transporte de lactato hacia las mitocondrias de *E. gracilis*. A) Transporte del lactato con respecto al tiempo. B) Efecto de algunos inhibidores sobre el transporte y C) sobre la actividad enzimática de la L-iLDH. 1) Control, 2) Oxalato 2 mM, 3) Oxamato 3 mM, 4) MersalyI 40 nmol/mg prot., 5) N-etilmaleimida 200 μM, 6) α-ciano-4-hidroxicinamato 100 μM, 7) estigmatelina 500 pmoles y, 8) D-lactato 30 mM. El control del transporte fue de 11.2 ± 0.98 nmol de lactato/min./mg de prot. La actividad de iLDH fue de 280.7 ± 84 nmol DCPiP_{red}/min./mg de prot. Los datos muestran el promedio \pm la desviación estándar de tres experimentos. * P=0.05 vs control.

Si se asume un equilibrio rápido para la interacción enzima-sustrato, los parámetros termodinámicos de la reacción de disociación del complejo enzima-sustrato en la deshidrogenación del L- y D-lactato pueden calcularse usando la última ecuación descrita.

En consecuencia, se determinaron los valores de la K_s a diferentes temperaturas. En la figura 4A y 4B se observa que conforme se aumenta la temperatura la velocidad máxima aumentó no importando el isómero utilizado, siendo siempre mayor con D-lactato. La afinidad por el L-lactato disminuyó conforme se aumentó la temperatura (figura 4A), mientras que la afinidad para el D-lactato aumentó (4B). Se obtuvieron los parámetros ΔG (a 30°C), ΔH° y ΔS° de la reacción de disociación del complejo enzima-sustrato cuando graficamos el logaritmo de las K_s (en concentraciones molares) contra el inverso de la temperatura absoluta, de acuerdo con la ecuación anterior (figura 4A y 4B). Los valores de K_s y los parámetros termodinámicos se resumen en la tabla 2.

Efecto del oxamato y oxalato sobre la actividad de la iLDH.

El oxamato es un inhibidor clásico de las lactato deshidrogenasas citosólicas dependientes de NAD^+ y de las iLDH's bacterianas asociadas a membrana (Garvie, 1980). Se han reportado constantes de inhibición (K_i) para oxamato en las iLDH entre 10^{-6} a 10^{-3} M y tipos de inhibición competitivo y no competitivo dependiendo del organismo (Barnes y Kaback, 1970; Markwell y Lascelles, 1978; Garvie, 1980).

En las mitocondrias de *E. gracilis*, la deshidrogenación de los dos isómeros del lactato también se vio afectada por este inhibidor. En las figuras 5 y 6 se muestran gráficos de dobles recíprocos con el respectivo re gráfico, en la figura 7

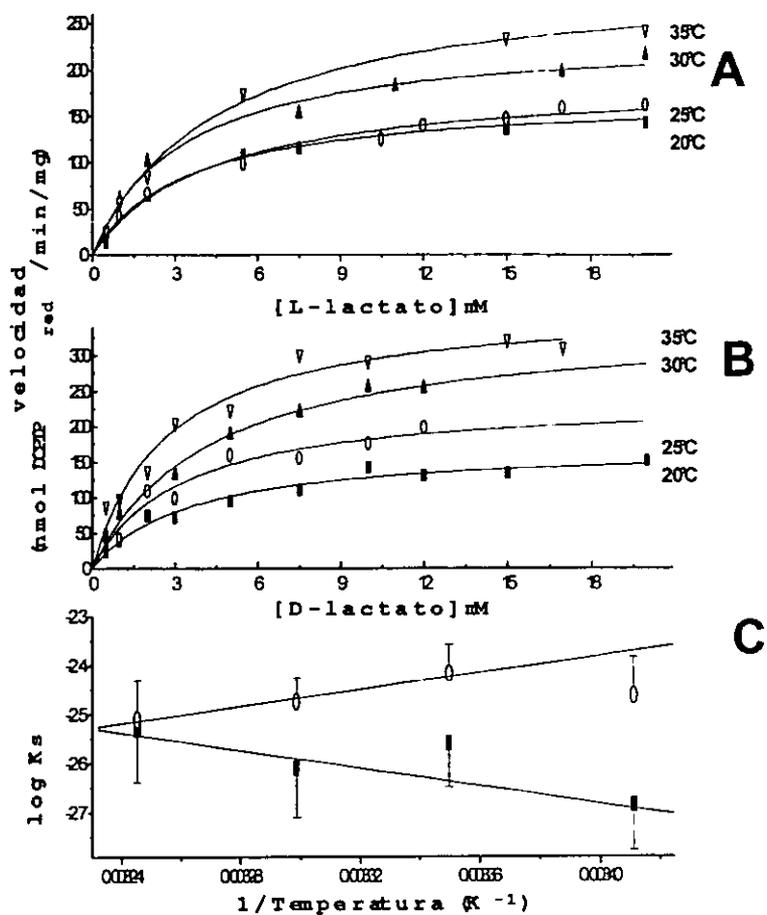


Figura 4. Parámetros termodinámicos de la disociación del complejo-enzima-sustrato. Oxidación de A) L-lactato, B) D-lactato a diferentes concentraciones y temperaturas. El valor de las distintas K_s (en concentración Molar) obtenidas se graficaron en (C) contra $1/T$ (K^{-1}) para obtener los parámetros termodinámicos, (■) L-lactato, (○) D-lactato. Los valores son la $X \pm D.S$ de al menos cuatro experimentos.

Tabla 2. Parámetros termodinámicos de la disociación del complejo enzima-sustrato en la oxidación de lactato en las mitocondrias de *E. gracilis*. El ΔH se obtuvo de la pendiente y el ΔS de la ordenada al origen de la gráfica 4B. Los valores son el promedio \pm desviación standard de al menos cuatro experimentos.

	L-lactato K_s (mM)	D-lactato K_s (mM)
20°C	2.06 \pm 1.2	3.44 \pm 0.80
25°C	2.75 \pm 1.2	3.82 \pm 0.87
30°C	2.45 \pm 0.8	3.09 \pm 0.89
35°C	3.08 \pm 0.7	3.0 \pm 0.83
ΔS (cal/mol K)	+1.68	-24.8
ΔH (Kcal/mol)	+4.11	-4.09
$\Delta G_{30^\circ C}$ (Kcal/mol)	+3.59	+3.42

se presentan gráficos de Dixon para L- (fig. 7A) y D-lactato (fig 7B) respectivamente. El tipo de inhibición del oxamato fue competitivo para la deshidrogenación de los dos isómeros de lactato. Los valores de K_i calculados en los gráficos de dobles recíprocos se muestran en la tabla 3A. Los mismos datos se analizaron para obtener los valores de la K_i y el tipo de inhibición por regresiones de tipo no lineal (Tabla 3B).

El oxalato es otro inhibidor ya reportado de la iLDH, con valores de K_i desde concentraciones micromolares hasta milimolares dependiendo el organismo. Sin embargo, se han reportado tipos de inhibición competitiva y no competitiva en las enzimas bacterianas (Barnes y Kaback, 1979; Garvie, 1980; Allison y col, 1985) y de tipo mixto en levaduras (Gondry y Lederer, 1996).

En el caso de las mitocondrias de *E. gracilis*, mediante

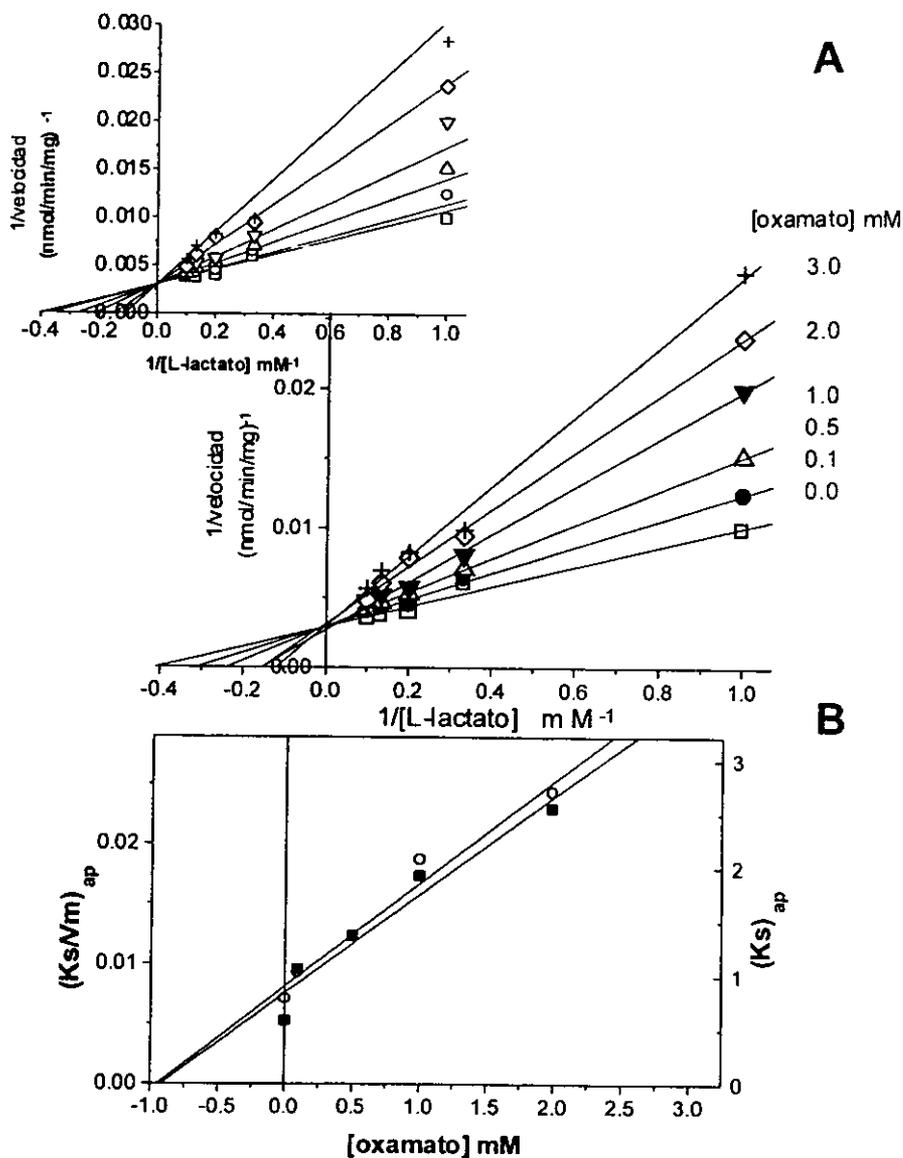


Figura 5. Efecto del oxamato sobre la actividad de L-iLDH mitocondrial de *E. gracilis*. (A) Gráfico de dobles recíprocos, el inserto es un gráfico de dobles recíprocos donde las rectas se obtuvieron de los datos generados por la regresión no lineal. Las concentraciones de oxamato se muestran en la figura. (B) Regráficos del intercepto a las abscisas y de las pendientes obtenidos de la figura 5A. La figura es representativa de 7 experimentos.

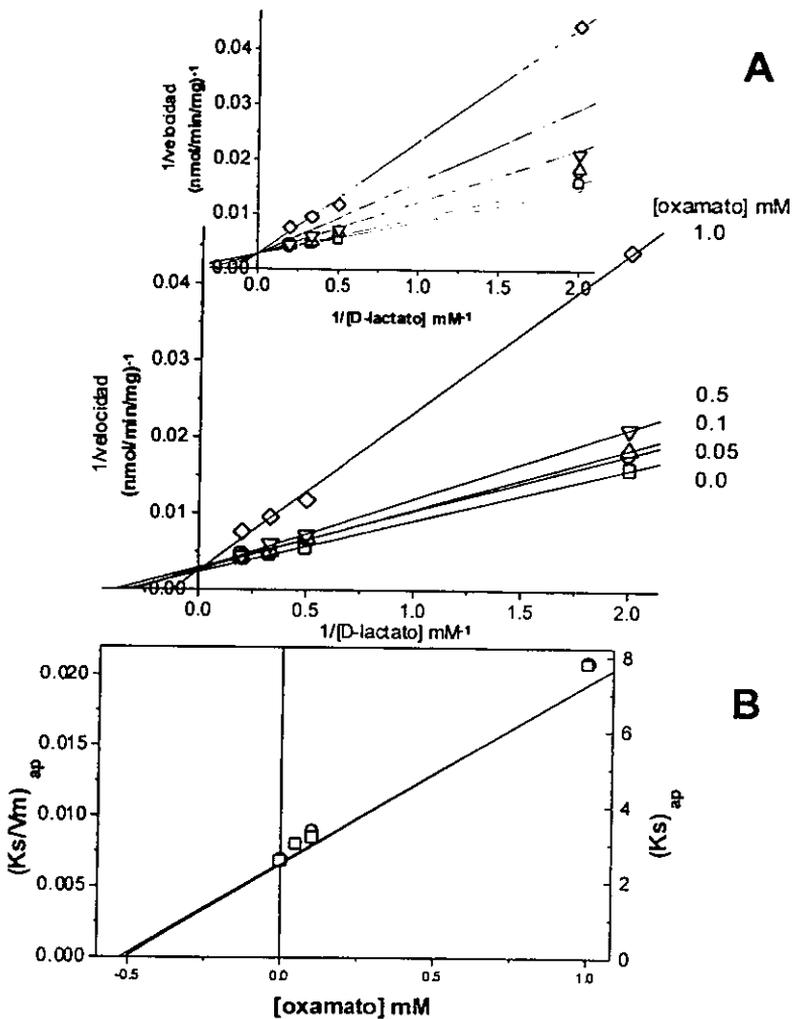


Figura 6. Efecto del oxamato sobre la actividad de D-iLDH mitocondrial de *E. gracilis*. (A) Gráfico de dobles recíprocos, el inserto es un gráfico de dobles recíprocos donde las rectas se obtuvieron de los datos generados por la regresión no lineal. Las concentraciones de oxamato se muestran en la figura. (B) Regráficos del intercepto a las abscisas y de las pendientes obtenidos de la figura 5A. La figura es representativa de 7 experimentos.

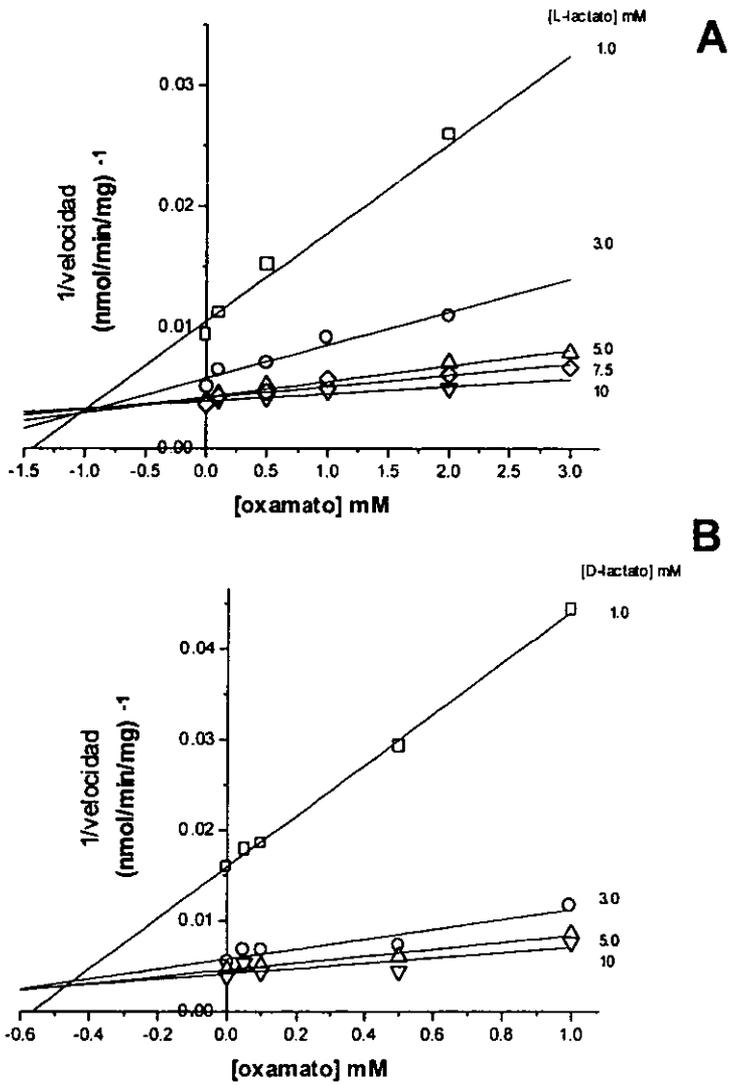


Figura 7. Gráficos de Dixon para la inhibición por oxamato de la deshidrogenación de L- y D-lactato. (A) Inhibición de la actividad de L-iLDH, (B) Inhibición de la actividad de D-iLDH. Las concentraciones de L- o D-lactato se muestran en la figura. La figura es representativa de 7 y 8 experimentos respectivamente.

gráficos de dobles recíprocos y de regresión no lineal, se determinó que el tipo de inhibición es mixto. En las figuras 8 y 9 se muestran los gráficos de dobles recíprocos y en la figura 10 los gráficos de Dixon para el L- y D-lactato. De manera interesante, se encontró que los valores de K_i eran distintos según el isómero de lactato utilizado, siendo menor la K_i cuando el sustrato fue D-lactato. Los valores de K_i calculados mediante gráficos de dobles recíprocos se muestran en la Tabla 4A, y en la tabla 4B los valores calculados por regresión no lineal.

Tabla 3. Constantes de inhibición (K_i) para el oxamato en la deshidrogenación de lactato en mitocondrias de *E. gracilis* calculadas a partir de A, gráficos de dobles recíprocos. B, regresión no lineal. Los valores corresponden a l promedio \pm error estándar, n es el número de experimentos.

(A)	L-lactato	D-lactato
K_{ic} (mM)	1.2 ± 0.3 (7)	0.51 ± 0.1 (8)

(B)	L-lactato	D-lactato
	Competitivo	Competitivo
χ^2	153	110
V_n	248 ± 48 (7)	477 ± 57 (7)
K_s (mM)	2.17 ± 0.5 (7)	4.3 ± 1.1 (6)
K_i (mM)	0.95 ± 0.19 (7)	0.38 ± 0.09 (6)

Efecto de la temperatura.

Con el fin de dilucidar si la deshidrogenación del L- y D-lactato se llevaba a cabo por una enzima inespecífica para

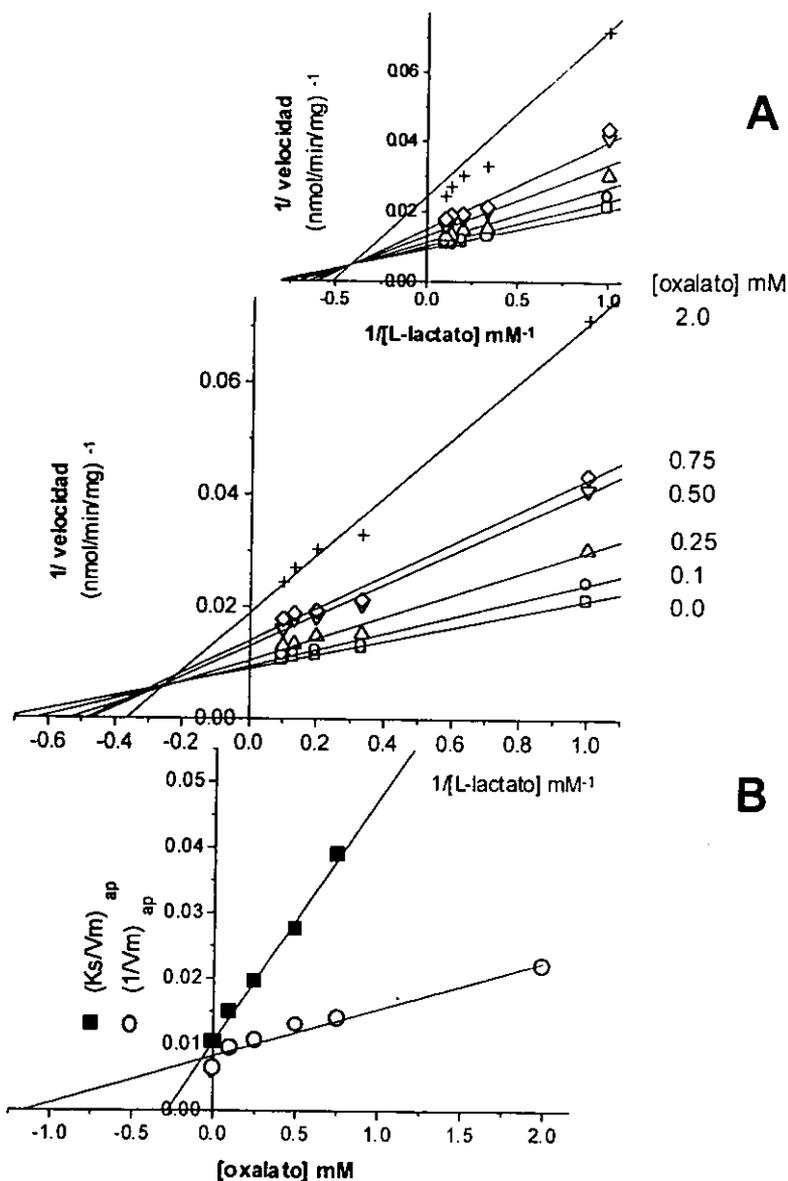


Figura 8. Efecto del oxalato sobre la actividad de L-iLDH mitocondrial de *E. gracilis*. (A) Gráfico de dobles recíprocos, el inserto es un gráfico de dobles recíprocos donde las rectas se obtuvieron de los datos generados por la regresión no lineal. Las concentraciones de oxalato se indican en la figura (B) Regráficos del intercepto a las ordenadas y de las pendientes obtenidos de la figura 8A. La figura es representativa de 8 experimentos.

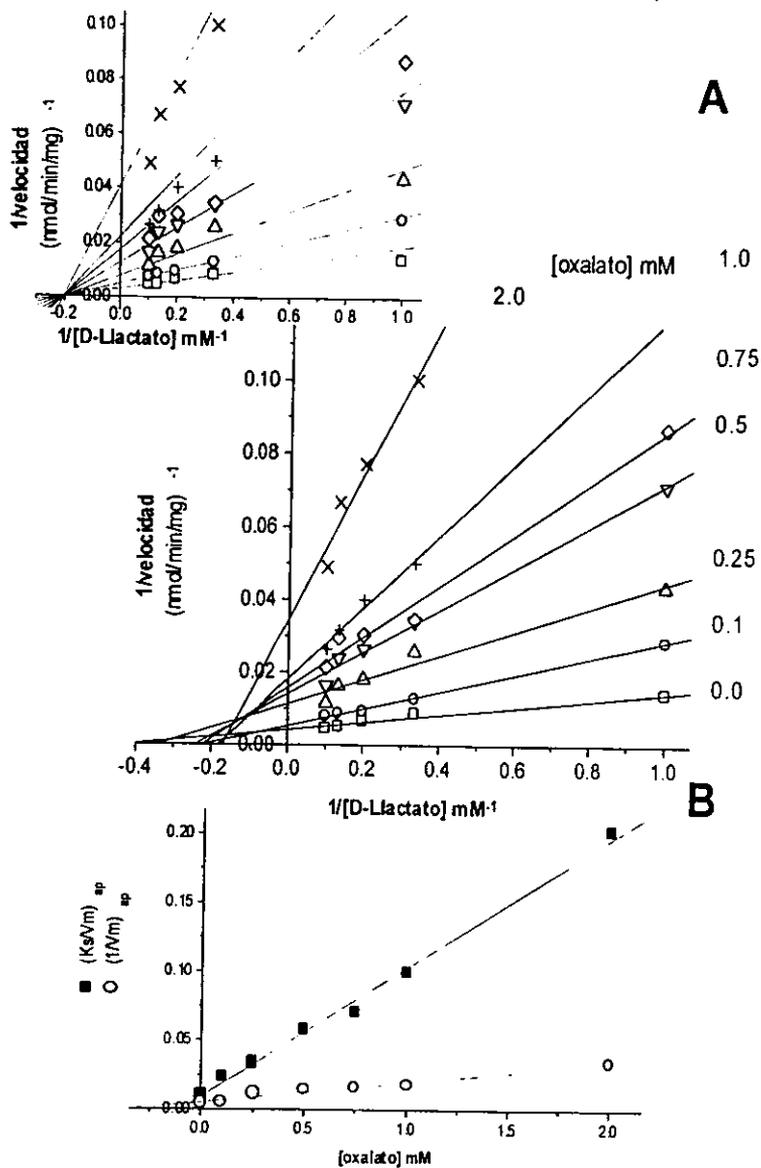


Figura 9. Efecto del oxalato sobre la D-iLDH mitocondrial de *E. gracilis*. (A) Gráfico de dobles recíprocos, el inserto es un gráfico de dobles recíprocos donde las rectas se obtuvieron de los datos generados por la regresión no lineal. Las concentraciones de oxalato se indican en la figura (B) Regráficos del intercepto a las ordenadas y de las pendientes obtenidos de la figura 8A. La figura es representativa de 8 experimentos.

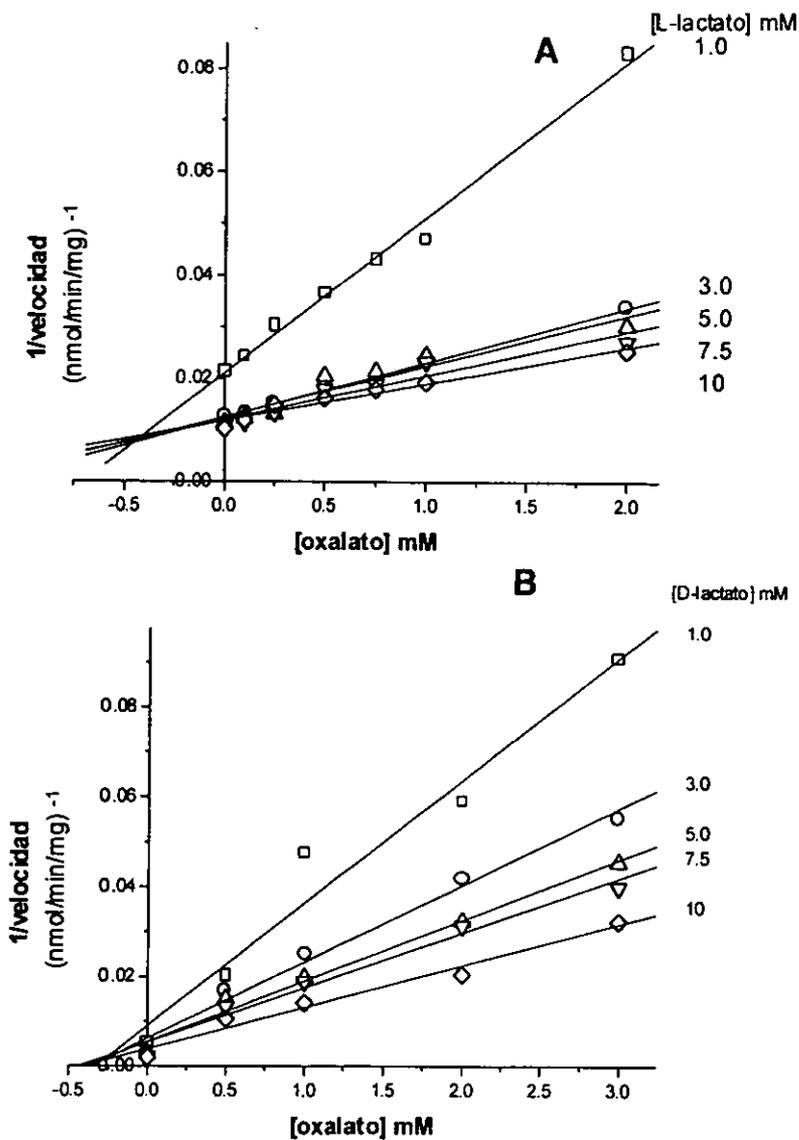


Figura 10. Gráficos de Dixon para la inhibición por oxalato de la deshidrogenación de L- y D-lactato. (A) Inhibición de la actividad de L-iLDH, (B) Inhibición de la actividad de D-iLDH. Las concentraciones de L- o D-lactato se muestran en las gráficas. La figura es representativa de 10 y 9 experimentos.

Tabla 4. Constantes de inhibición (K_i) para el oxalato en la deshidrogenación de lactato en mitocondrias de *E. gracilis* calculadas con A, gráficos de dobles recíprocos y B por regresión no lineal. Los valores corresponden a la $X \pm E.S.$ (n)

(A)	L-lactato	D-lactato
K_{ic} (mM)	0.28 ± 0.03 (8)	0.09 ± 0.01 (8) *

(B)	L-lactato	D-lactato
	Mixto	Mixto
χ^2	64	111
V_m	289 ± 43 (11)	448 ± 77 (11)
K_s (mM)	2.6 ± 0.4 (11)	2.7 ± 0.4 (11)
	$\alpha = 5.0 \pm 1.5$	$\alpha = 1.3 \pm 0.2$
K_{ic} (mM)	0.26 ± 0.08 (11)	0.09 ± 0.01 (11)

* $P < 0.05$ D-Lac. vs L-Lac.

el sustrato o por enzimas estereo-específicas, determinamos la sensibilidad de estas actividades frente a la inactivación térmica (k_{inac}) sobre la deshidrogenación de ambos isómeros en las mitocondrias de *E. gracilis*.

En las figuras 11 y 12 se muestra que conforme se aumenta la temperatura de incubación la actividad de deshidrogenasa presenta un decaimiento exponencial simple; en el caso de la deshidrogenación del L-lactato la inactivación por calor fue mucho más rápida que con D-lactato. De las pendientes de las rectas de los insertos se obtuvieron las k_{inac} . Experimentos semejantes se realizaron en presencia de ligandos (oxamato, oxalato, el isómero opuesto y el mismo isómero) que confirieron protección a la inactivación térmica, disminuyendo así los valores de k_{inac} como se observa en la figura 13. De esta figura se puede observar que con L-

lactato la actividad se pierde rápidamente a los 70°C y que los ligandos utilizados confieren protección disminuyendo la k_{inac} ya que la actividad se mantiene a temperaturas más altas. Con D-lactato los valores de k_{inac} se mantienen bajos hasta los 80°C, no importando si hay o no ligando en la incubación de las mitocondrias. Se obtiene una inactivación similar sin ligando con respecto a la k_{inac} con L-lactato pero hasta los 90°C. Estos datos apoyan la existencia de dos enzimas termo-resistentes, siendo la D-iLDH la más resistente.

Si los valores de k_{inac} se grafican ahora contra el inverso de la temperatura absoluta, se puede calcular la energía de desnaturalización por medio de un gráfico de Arrhenius de acuerdo a la ecuación:

$$\log k_{inac} = -(E_a/2.3R) (1/T) + \log k_0$$

En la figura 14 se muestra el gráfico de Arrhenius para los dos sustratos. los valores de la energía de desnaturalización que se obtuvieron a partir de las pendientes fueron de 44 y 55.7 Kcal/mol para L- y D-lactato respectivamente.

De manera interesante, cuando se incubaban las mitocondrias con el isómero opuesto al utilizado como sustrato, se observó una gran protección contra la inactivación térmica. Este resultado sugiere que los dos isómeros se unen a la misma enzima, o bien que el otro isómero se puede unir a la enzima. Para resolver esta pregunta incubamos a las mitocondrias de *E. gracilis* a 70°C tomando muestras a diversos tiempos hasta disminuir prácticamente a cero la actividad de L-iLDH. En la figura 15 se muestra que la actividad de L-iLDH desaparece aproximadamente entre 100 y 120s de incubación, mientras que

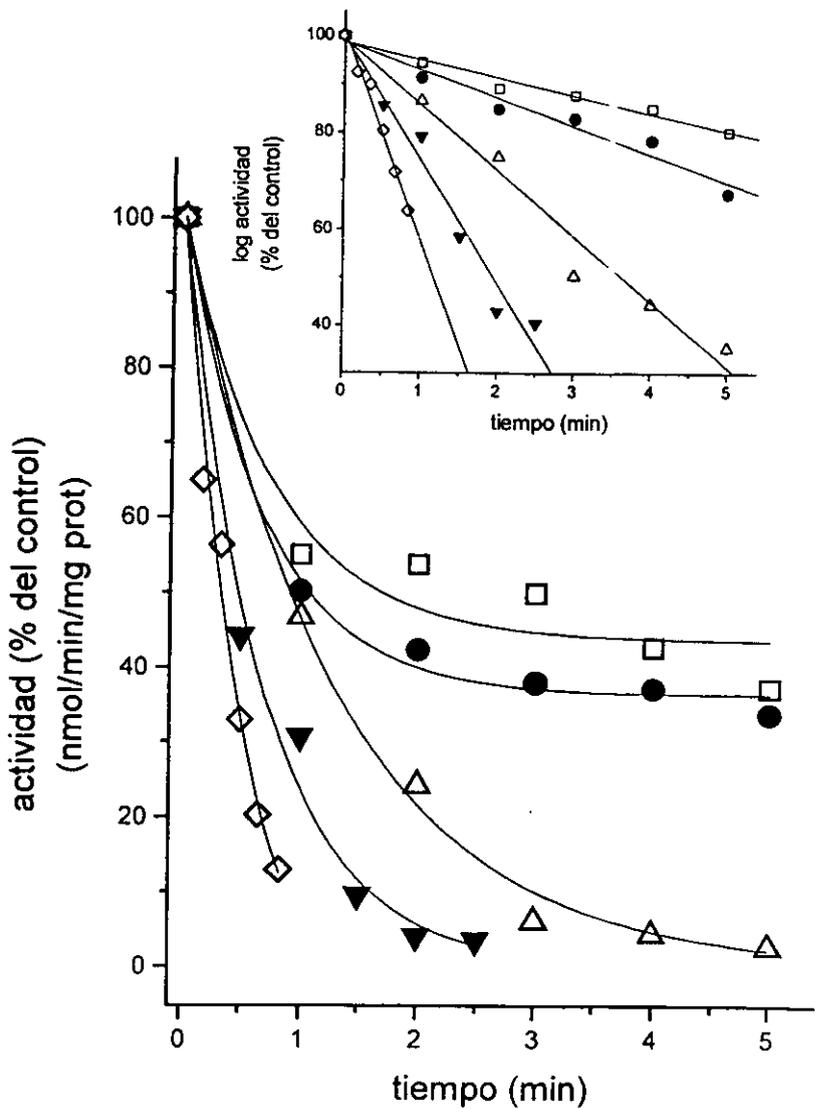


Figura 11. Efecto de la temperatura en la deshidrogenación del L-lactato en mitocondrias de *E. gracilis*. Las temperaturas utilizadas fueron 45°C (■), 50°C (○), 55°C (△), 60°C (▼) y 65°C (◇). Las líneas son el ajuste no lineal de un decaimiento exponencial simple.

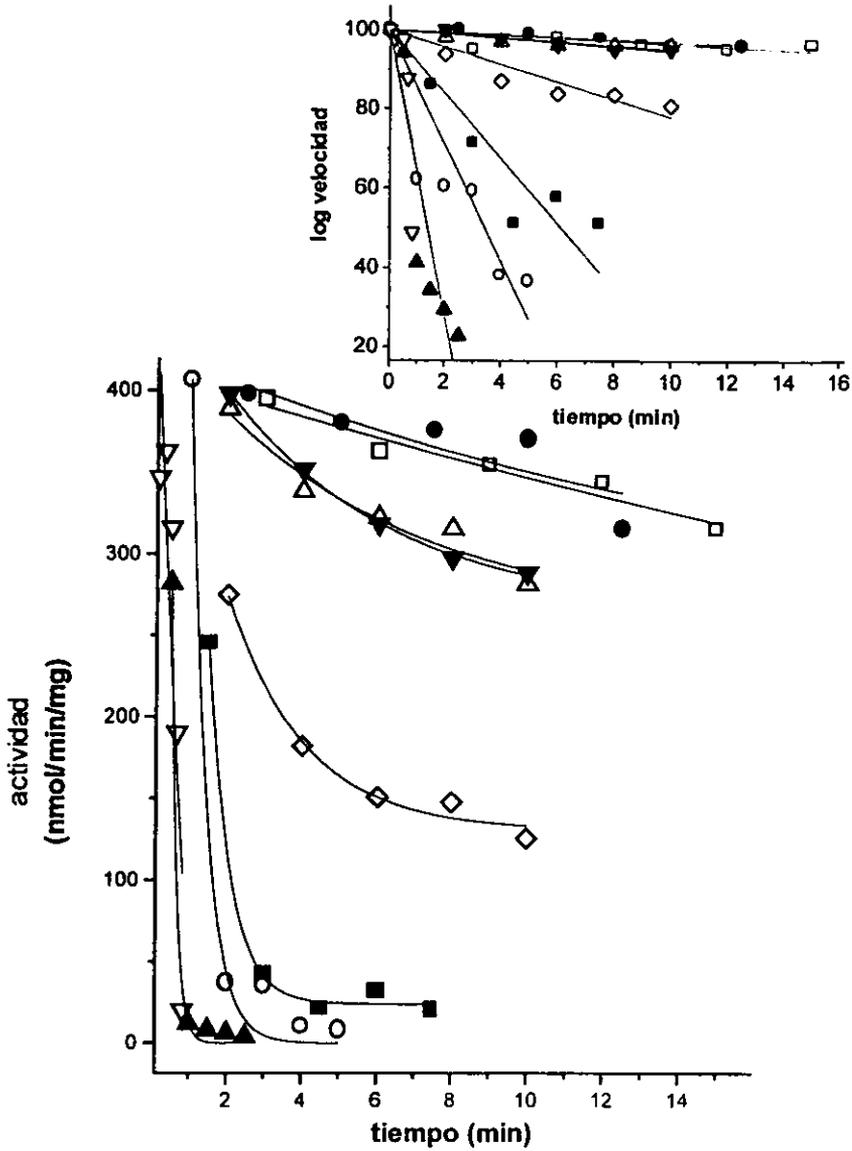


Figura 12. Efecto de la temperatura en la deshidrogenación del D-lactato en mitocondrias de *E. gracilis*. Las temperaturas utilizadas fueron 45°C (□), 50°C (•), 55°C (Δ), 60°C (▼) y 65°C (◇), 70°C (■), 75°C (○), 80°C (▲) y 85°C (▽). Las líneas son el ajuste no lineal de un decaimiento exponencial simple.

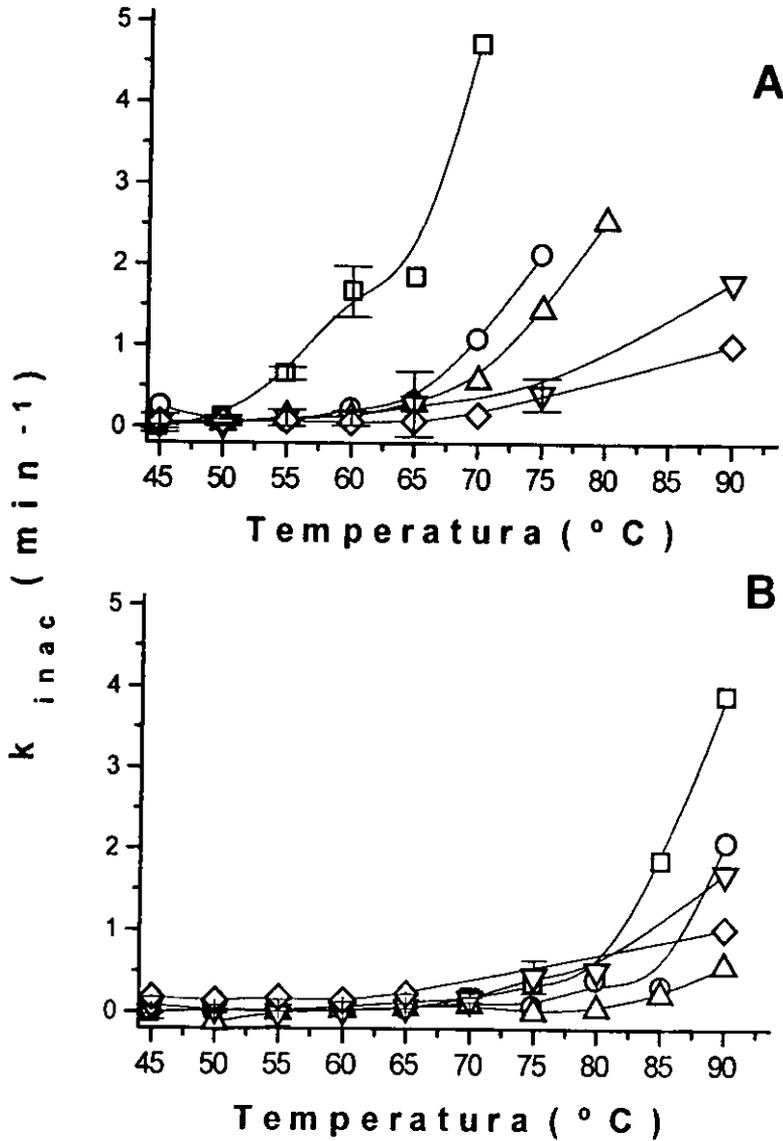


Figura 13. Efecto de los tratamientos térmicos sobre la actividad de iLDH mitocondrial de *E. gracilis*. Las mitocondrias fueron incubadas a diferentes temperaturas en ausencia de ligandos (\square), ó en presencia de oxamato 5 mM (\bullet), oxalato 5 mM (Δ), el isómero opuesto 5mM (\blacktriangledown) ó el mismo sustrato 5 mM (\diamond). Posteriormente se midió la actividad de L-iLDH (A) y D-iLDH (B), a diferentes tiempos. La concentración de L- y D-lactato fue de 20 mM.

la actividad de D-iLDH se mantiene intacta hasta ese tiempo. Eliminada ya la L-iLDH, se midió la dependencia a la concentración de sustrato de la D-iLDH. Los resultados mostraron que ni la V_m ni la K_s de la D-iLDH se modifican significativamente por la incubación de las mitocondrias a 70°C, mientras que la actividad con L-lactato no se ajusta ya a una cinética michaeliana, por lo que la baja actividad con este sustrato puede deberse a una actividad de la D-iLDH que esta deshidrogenando con muy baja afinidad al L-lactato (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros cinéticos obtenidos con la L- y D-iLDH de las mitocondrias de *E. gracilis* incubadas a 70°C durante 120 segundos. Las velocidades fueron hechas a 30°C. Los valores representan la $X \pm D.S.$ de 3 preparaciones diferentes.

Parámetro	L-lactato	D-lactato
V_m (nmol DCPIP _{red} /min./mg prot.)	56.6 ± 59	574 ± 92
K_s (mM)	0.72 ± 0.68	1.98 ± 0.4

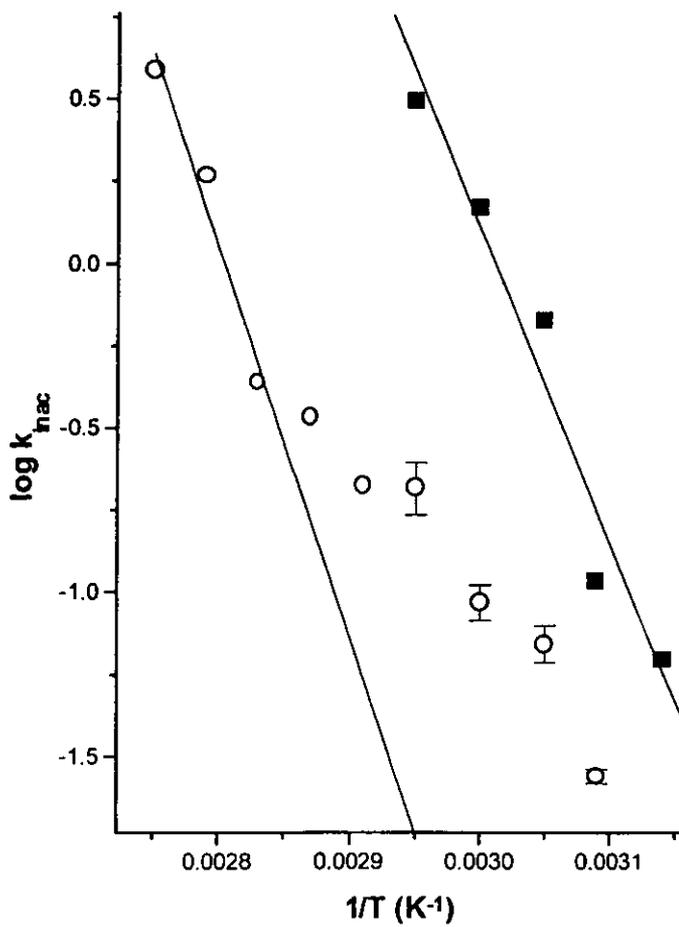


Figura 14. Energía de desnaturalización de iLDH mitocondrial de *E. gracilis*. Las k_{inac} se obtuvieron de las pendientes obtenidas en el gráfico de las figuras 11 y 12. (■) L-lactato, (○) D-lactato.

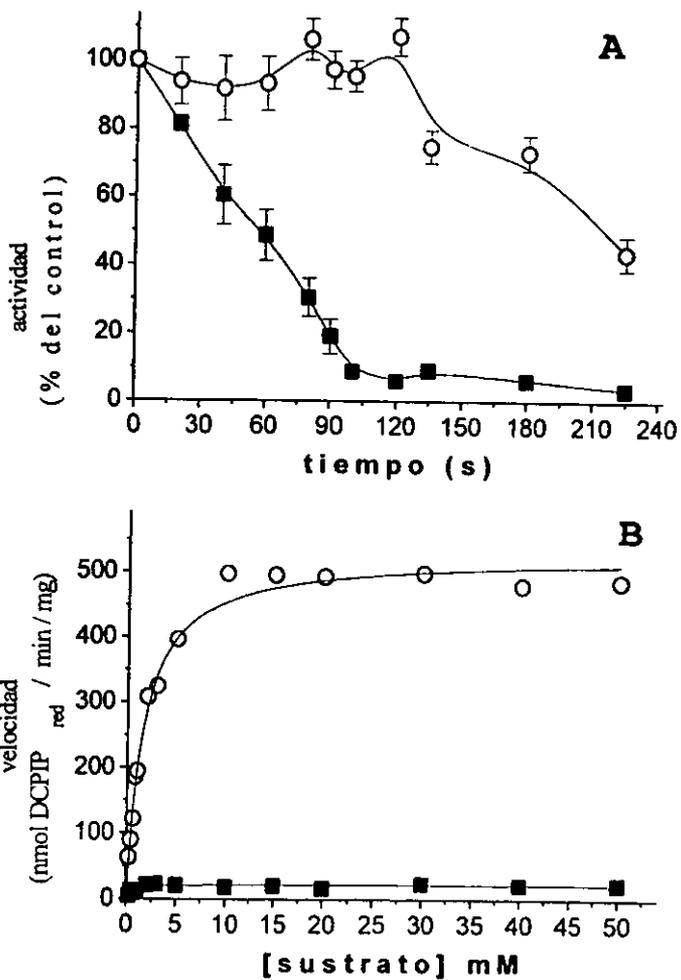


Figura 15. Inactivación térmica de la L-iLDH mitocondrial de *E. gracilis*. (A) Las mitocondrias se incubaron a 70°C, se tomaron muestras a diversos tiempos y se midió la actividad a 30°C con 20 mM de (■) L-lactato ó (○) D-lactato. Los valores representan el promedio \pm error estándar de 14 experimentos. (B) Después de la incubación durante 100-120s, se midieron actividades de iLDH variando la concentración de sustrato. La figura es representativa de 3 experimentos.

Mecanismo cinético.

Se procedió a estudiar el mecanismo cinético de la reacción de deshidrogenación de lactato. La figura 16 muestra gráficos de dobles recíprocos, con L- y D-lactato a concentraciones fijas, variando la concentración del aceptor de electrones DCPIP. En los gráficos de dobles recíprocos se observan familias de rectas paralelas lo que es distintivo de mecanismos de doble desplazamiento o de tipo ping-pong, en el cual la unión del primer sustrato provoca un cambio en la enzima (estado activado) aumentando la afinidad por el segundo sustrato (Segel, 1975). Este tipo de mecanismo es el mismo de las enzimas redox que participan en las cadenas transportadoras de electrones. Los parámetros cinéticos fueron calculados por regresión no lineal (Tabla 6).

Solubilización de las iLDH's.

En los primeros intentos por enriquecer la actividad de las enzimas mitocondriales de *E. gracilis* se utilizaron diversos detergentes con el fin de solubilizar a estas enzimas. Los detergentes probados (CHAPS, Octilglucósido, Lubrol, Tritón X100, Tween 20 y Desoxicolato) en general solubilizan a la D-iLDH. Con CHAPS, detergente zwitteriónico, se extrae principalmente a la D-iLDH e incluso se presenta una activación por este detergente; mientras que la L-iLDH no logra extraerse y pierde su actividad con la mayoría de los detergentes. El octilglucósido, un detergente iónico, logra extraer pobremente a la L-iLDH (Figura 17).

De la actividad total obtenida, suma de la solubilizada más la que permanece en el precipitado, después del tratamiento con los detergentes; el 82% de la D-iLDH es

solubilizada con CHAPS y el 60% de la L-iLDH es extraída con octilglucósido.

Tabla 6. Parámetros cinéticos obtenidos por regresión no lineal para un mecanismo cinético de doble desplazamiento (ping-pong) para la L- y D-iLDH mitocondriales de *E. gracilis*. Los valores representan el promedio \pm error estándar; el valor entre paréntesis es el número de experimentos

	L-lactato	D-lactato
V_m (nmol/DCPIP red/min/mg prot.)	347 \pm 65 (6)	577 \pm 70 (8)
K_s lactato (mM)	3.3 \pm 1.0 (6)	3.1 \pm 0.4 (8)
K_s DCPIP (μ M)	35 \pm 10 (6)	35 \pm 5 (8)

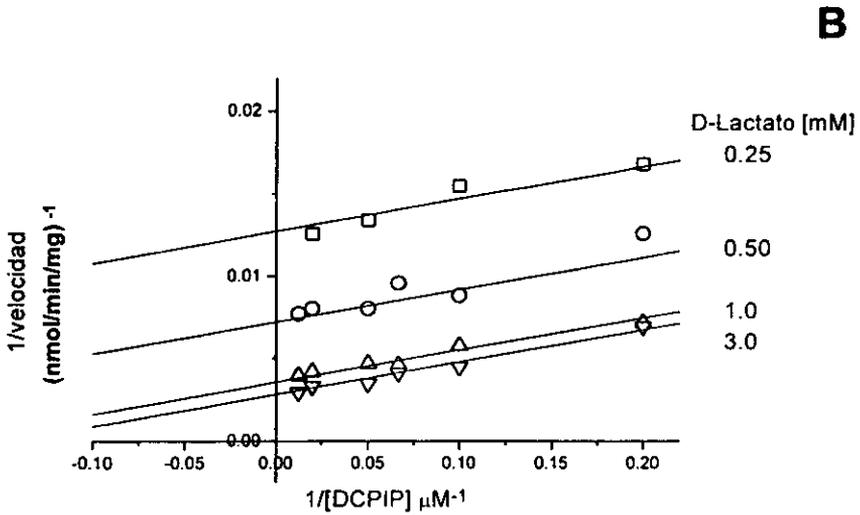
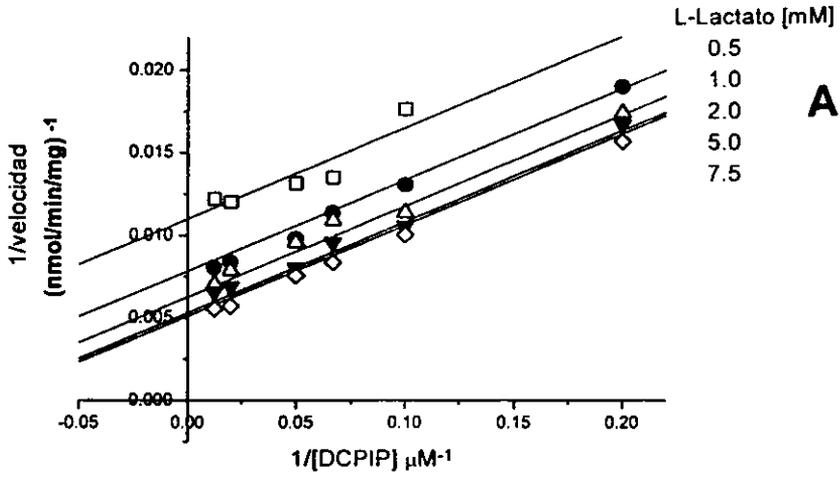


Figura 16. Gráficas de dobles recíprocos de la L-iLDH (A) y D-iLDH (B) mitocondriales de *E. gracilis*. Las concentraciones de L- y D-lactato utilizadas se indican en la figura. Las líneas son el valor inverso de los datos producidos por la regresión no lineal. Gráficas representativas de 6 experimentos.

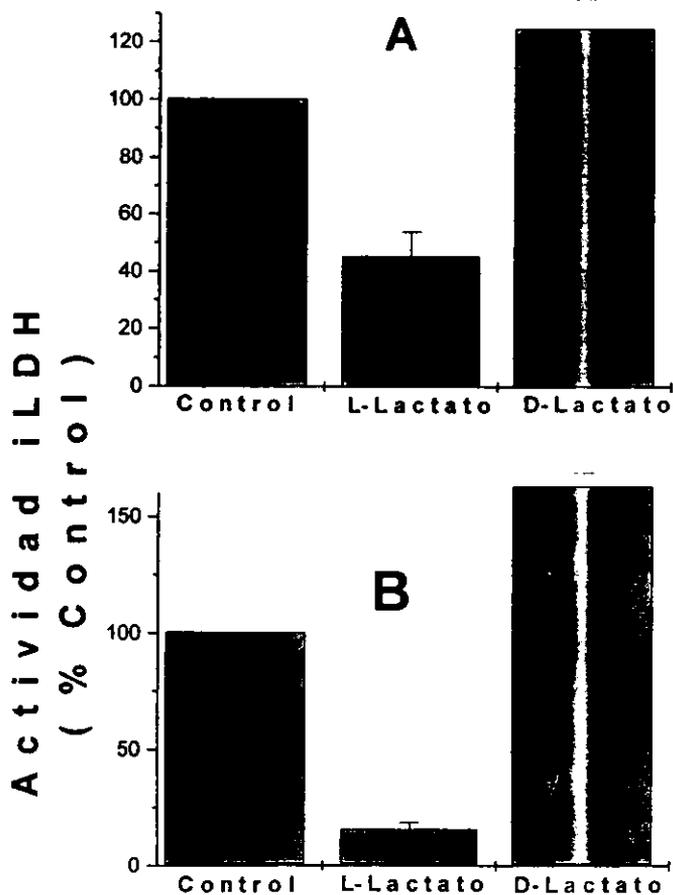


Figura 17. Solubilización con detergentes de las isoenzimas iLDH mitocondriales de *E. gracilis*. (A) Extracción con Octilglucósido. (B) Extracción con CHAPS. Las concentraciones de L- y D-lactato fueron 15 mM. El control es la actividad en mitocondrias intactas y fue de 309 ± 81 y 438 ± 57 nmol DCPIP_{red}/min/mg prot para L- y D-lactato, respectivamente. Los datos representan la $\bar{X} \pm$ ES de tres experimentos.

DISCUSIÓN.

Las mitocondrias del protista *E. gracilis* tienen la capacidad de oxidar una gran variedad de sustratos como succinato, 2-oxoglutarato, NADH extramitocondrial, glutamato y malato y otros metabolitos que no son utilizados comúnmente por mitocondrias de otros organismos, como ácido γ -amino butírico y principalmente semialdehído succínico y lactato en sus dos isoformas (Buetow, 1989; Uribe y Moreno-Sánchez, 1992). Esta última característica asemeja el metabolismo de *E. gracilis* con algunos sistemas bacterianos. Al igual que en éstos últimos, la oxidación del lactato está conectada directamente a la cadena respiratoria y la enzima está asociada a la membrana (Price, 1961; Ingledew y Poole, 1970; Kohn y Kaback, 1973; Allison y col., 1985). Sin embargo, hasta la fecha no se había descrito si la oxidación del lactato en las mitocondrias de *E. gracilis* se debe a una sola enzima capaz de deshidrogenar a los dos isómeros o bien, existen enzimas que sean específicas para cada uno de los isómeros del lactato.

En este trabajo se determinó mediante estudios cinéticos y termodinámicos que la oxidación del lactato en las mitocondrias de *E. gracilis* se lleva a cabo por enzimas estereo específicas.

El efecto del pH sobre la actividad mostró que la D-iLDH presenta una actividad mayor que la L-iLDH a cualquier valor de pH. Sin embargo, el pH óptimo donde coinciden ambas actividades está entre pH 7.3-7.6. En cuanto a la estabilidad de las iLDH, se observó que la actividad a pH 7.6 en ambas enzimas disminuyó después de pre-incubarse por cinco minutos a pH's entre 5 y 7, y fueron estables a pH's entre 7 y 9.

Estas semejanzas sugieren que la L- y D-iLDH pueden tener involucrados aminoácidos semejantes en la catalisis. Debido a que la actividad de iLDH no fue estable a valores bajos de pH, no fue posible calcular los pKa de dichos aminoácidos. El pH óptimo reportado para algunas iLDH presentes en bacterias varían desde pH 5 hasta 9 (Garvie, 1980), intervalo en el que se encuentran las iLDH de *E. gracilis*.

La oxidación del L- y D-lactato en sistemas bacterianos que presentan iLDH's unidas a membranas siguen una cinética de tipo michaeliano al igual que las iLDH de *E. gracilis*. En preparaciones membranales o en extractos crudos de bacterias, por ejemplo para la D-iLDH de *E. coli*, se ha reportado una K_m de 2.2 mM, aunque hay otros reportes de iLDH's que varían entre organismos, como la D-iLDH de *Acinetobacter calcoaceticus* con una K_m de 0.26 mM, y hasta valores mas altos como la D-iLDH y L-iLDH de *Neisseria meningitidis* con valores de K_m de 5.1 y 14 mM, respectivamente (Tabla II).

En cuanto a los aceptores de electrones se ha reportado al DCPIP como el más utilizado para el estudio de las iLDH unidas a cadenas respiratorias (Garvie, 1980). Su potencial redox (+0.217 V) semejante al sitio cercano al cit c_1 que es de +0.22 V, (Kumar y Acharya, 1999) hace suponer que la transferencia de electrones del lactato por las iLDH se ve facilitada hacia este aceptor. Se ha reportado para la D-iLDH de *A. calcoaceticus* que la concentración de DCPIP necesaria para llevar a cabo la mitad de la actividad máxima está entre 26 y 133 μ M (Allison y col., 1985), intervalo en el que se encuentra la K_s para este sustrato artificial en los dos tipos de iLDH mitocondriales de *E. gracilis* (Tabla 1).

Con respecto a la utilización de quinonas por las iLDH, se ha reportado que la D-iLDH de *E. coli* puede ceder los

electrones directamente a la ubiquinona (Ingledew y Poole, 1970). En este trabajo se midió directamente la actividad de la L- y D-iLDH en las mitocondrias de *E. gracilis* utilizando la quinona Q1. La afinidad de las iLDH por este aceptor de electrones fue semejante a la que se obtuvo para el DCPIP, ya que también se encontró en concentraciones micromolares. La velocidad máxima fue significativamente mayor con Q1, lo que sugiere que el aceptor fisiológico de las iLDH mitocondriales de *E. gracilis* es una quinona. En el caso de este protista existen dos tipos de quinonas en su poza, la ubiquinona-9 y la rodoquinona-9. La Q9 que tiene 9 grupos isoprenoides en la posición 5 de la quinona y la rodoquinona-9, que tiene un grupo amino en la posición 2 del anillo bencénico, en vez del grupo metoxi de la Q9; las cuales difieren en su potencial redox que es de +100 mV y -63 mV respectivamente.

En trabajos realizados en nuestro laboratorio con mitocondrias aisladas y alimentadas con lactato, el complejo bc_1 y el componente resistente a antimicina oxidan preferentemente al decilbenzoquinol y al duroquinol, respectivamente (Moreno-Sánchez y col., 2000). Las formas oxidadas de estas quinonas son pobres sustratos de la L- y D-iLDH, mientras que el mejor sustrato para las deshidrogenasas fue Q1. Estos datos sugieren que las iLDH's tienen una afinidad diferente por las quinonas disponibles que la que tiene el complejo bc_1 . La posibilidad de establecer enlaces de hidrógeno adicionales con el grupo amino de la rodoquinona-9, conduciría a que las iLDH tengan una diferente afinidad por la rodoquinona.

Las semejanzas entre las iLDH de los sistemas bacterianos y las mitocondriales de *E. gracilis* en las afinidades por los sustratos, tanto lactato como de aceptores de electrones, el que sean membranales y que estén conectadas

a la cadena respiratoria hacen suponer que las enzimas encontradas en estos organismos tienen un origen común.

Las cinéticas obtenidas para los aceptores de electrones mostraron una inhibición por sustrato por parte de los mismos, debido quizá tal vez a la unión de los aceptores a formas "erróneas" de la enzima, esto es, a una enzima que se encuentre oxidada o a una forma en la que el lactato se encuentre unido a la enzima pero aún no se hayan transferido los electrones a la flavina (Segel, 1967). Otra posibilidad de esta inhibición puede ser un artificio puramente técnico, ya que el DCPIP a altas concentraciones impide el paso de luz a través de la celda de ensayo siendo más difícil medir los cambios en la absorbencia. En el caso de la Q1 a altas concentraciones puede haber problemas con la solubilidad de este sustrato, ya que precipita y esto altera la concentración real en el ensayo.

En *E. coli* se ha reportado que la D-iLDH se encuentra asociada a la superficie interna de la membrana citoplasmática (Short y Kaback, 1975). En el caso de *E. gracilis* la localización del sitio activo de las iLDH era de crucial importancia ya que si éstas estuvieran en la superficie interna de la membrana mitocondrial los ensayos de actividad pudiesen estar midiendo la actividad del transportador de lactato mas que la velocidad enzimática de las iLDH. Para dilucidar este problema medimos el transporte del lactato a través de la mitocondria utilizando [¹⁴C]L-lactato y su sensibilidad a diferentes inhibidores del transporte de iones y metabolitos.

La N-etil maleimida y el α -ciano-4-hidroxycinamato que inhiben tanto al acarreador de fosfatos (Silva y col., 1999), como el acarreador de dicarboxilatos (Pallotta y col., 1999),

en las mitocondrias de *E. gracilis* no tuvieron un gran efecto sobre el transporte de lactato. Las condiciones utilizadas para ver el efecto de los inhibidores fueron las que usamos para medir las actividades de la iLDH, sin embargo no se descarta que las concentraciones utilizadas no fueron lo suficientemente altas para inhibir el transporte de lactato y/o que la accesibilidad de los grupos reactivos sensibles a los inhibidores no sea la óptima, ya que el inhibidor y el lactato se ponían al mismo tiempo. Por su parte el mersalyl, un derivado mercurial que inhibe fuertemente al acarreador de fosfatos ($IC_{50}=0.2\mu M$; Silva y col., 1999), sí inhibió significativamente el transporte de lactato en las mitocondrias, por lo que se puede sugerir que el transportador que acarrea el lactato hacia adentro de las mitocondrias es más sensible a los compuestos mercuriales como el mersalyl que a la N-etilmaleimida. De acuerdo con lo anterior, en este transportador están involucrados grupos sulfhidrilo esenciales para el transporte seguramente expuestos al exterior, ya que la membrana mitocondrial no es permeable al mersalyl.

En las mitocondrias de *E. gracilis* la estigmatelina inhibe al complejo bc₁ y a la vía resistente a antimicina (Moreno-Sánchez y col., 2000); en nuestro caso ésta no tuvo efecto sobre el transporte de lactato, lo que indica que no se requiere de la formación de un gradiente de protones para que se lleve a cabo el transporte de lactato.

El oxalato, el oxamato y el D-lactato, no afectaron significativamente el transporte de lactato. El que su estructura química sea similar a la del L-lactato hace pensar en una inhibición del transporte por competencia, lo que sugiere que ambos isómeros utilizan el mismo transportador,

similar a lo que ocurre con el transportador de lactato en cardiomiocitos aislados (Poole y col., 1989).

A continuación se midieron las actividades de iLDH con L-lactato a 30°C en presencia de los inhibidores ya mencionados. Contrario a lo que sucedió en los experimentos de transporte, el oxalato y el oxamato inhibieron significativamente la actividad de iLDH 86% y 46% respectivamente. Mientras que ni los inhibidores del transporte de metabolitos, ni la estigmatelina, mostraron efecto sobre la actividad de deshidrogenasa.

La conclusión de estos resultados es que aunque el lactato entra a la mitocondria, éste no necesita ser internalizado para su deshidrogenación por la iLDH; hecho que contrasta con las mitocondrias de algunos órganos en ratas, en donde el lactato necesita internalizarse a la mitocondria por el acarreador de monocarboxilatos para poder ser oxidado (Brooks y col., 1999).

Otra evidencia que sugiere que el sitio catalítico de la iLDH está orientado hacia la cara externa de la membrana interna es que si comparamos el transporte de lactato a través de las mitocondrias observamos que éste no soporta la actividad de iLDH medida a esa misma concentración de L-lactato. Además, el aceptor artificial de electrones utilizado en los ensayos, el DCPIP, no permea la membrana mitocondrial. Nuestras evidencias apoyan el que las velocidades de deshidrogenasa que medimos son debidas a la enzima y no al presunto transportador de lactato.

El equilibrio rápido asume que sólo los primeros componentes de la reacción se encuentran en equilibrio, esto es; la enzima, el sustrato y el complejo enzima-sustrato. Si nosotros asumimos que éste es el comportamiento de las iLDH's en el cual todos los pasos de unión y disociación son muy

rápidos comparados al paso catalítico, (Segel, 1975) podemos así calcular los parámetros termodinámicos de la reacción de disociación del complejo enzima-sustrato en la deshidrogenación del L- y D-lactato.

Las cinéticas en las cuales variamos la concentración del L- y D-lactato respectivamente a diversas temperaturas mostraron que conforme se aumenta la temperatura hasta 35° C, la velocidad máxima aumentó, la afinidad de la iLDH por L-lactato disminuyó, mientras que la afinidad por el D-lactato aumentó. Estos comportamientos diferentes con los dos isómeros se vieron reflejados al graficar el log de la K_s en concentraciones molares contra el inverso de la temperatura, cuya pendiente de las rectas nos da el valor del ΔH y la ordenada al origen el valor de ΔS . El hecho de haber obtenido líneas rectas al graficar el logaritmo de K_s contra el inverso de la temperatura, sugiere que la aproximación de equilibrio rápido que se asumió se ajustó bien al mecanismo cinético de las iLDH presentes en *E. gracilis*. La diferencia en el sentido de las pendientes, refleja diferencias en los parámetros termodinámicos. Es importante puntualizar que los parámetros que calculamos son de disociación, por lo que los signos son contrarios a los que se esperarían en caso de reacciones de asociación. En el caso de la L-iLDH la reacción de disociación del complejo enzima-sustrato es espontánea ($\Delta G > 0$), como resultado de un componente entálpico tan positivo (exergónico) que supera la contribución del componente entrópico negativo. El caso de la D-iLDH es totalmente opuesto. Aunque la reacción de disociación del complejo enzima-sustrato también es espontánea, la reacción es endergónica, esto es, necesita tomar calor del sistema para que la reacción se lleve a cabo ($\Delta H < 0$). Sin embargo, la

entropía en este caso es lo suficientemente negativa para predominar sobre el componente entálpico. (Tabla 2). Las diferencias en los parámetros termodinámicos sugieren la existencia de dos tipos de enzimas con afinidades específicas y características fisicoquímicas diferentes para la deshidrogenación del L- y D-lactato a las temperaturas que se ensayaron. La posible explicación de por qué aumenta la afinidad por el D-lactato conforme aumenta la temperatura puede estar en relación con la mayor resistencia de esta enzima a la temperatura e incluso una activación de la D-iLDH entre 65 y 70°C. Mientras que con la L-iLDH a las temperaturas del ensayo, ya se puede observar una disminución en la afinidad por el sustrato debida tal vez, a su mayor sensibilidad al calor.

El oxamato es un inhibidor de las iLDH's bacterianas. Pero se han reportado tipos de inhibición competitivo o no competitivo y constantes de inhibición muy diferentes en bacterias como *E. coli* y *Rhodopseudomonas sphaeroides* (Tabla II).

En las mitocondrias de *E. gracilis* probamos el efecto del oxamato como parte de la caracterización cinética de la oxidación del lactato. En los gráficos de Dixon, donde se grafica la concentración del inhibidor contra el inverso de la velocidad a diversas concentraciones de lactato, se puede calcular directamente la K_i con el punto de intersección de las rectas. Se observó además, que el oxamato inhibe ambas actividades de iLDH y aparentemente más a la D-iLDH ($K_{ic} = 1.1 \pm 0.2$ y $K_{ic} = 0.48 \pm 0.07$ para la deshidrogenación de L- y D-lactato respectivamente). Los gráficos de doble recíproco mostraron una inhibición competitiva para ambos isómeros del lactato. Se procedió entonces a tomar el valor de las

pendientes $(K_s/V_m)_{ap}$ y los intersecciones con las abscisas $(K_s)_{ap}$ y se regraficaron contra la concentración de oxamato, logrando así calcular las constantes de inhibición por dobles recíprocos. Los regráficos mostraron constantes de inhibición similares a los obtenidos con los gráficos de Dixon (Tabla 3A).

Otra forma que utilizamos para determinar el tipo de inhibición y la K_i fue por el cálculo de la regresión no lineal de la gráfica de velocidad enzimática vs la concentración del sustrato. En este caso se editaron las ecuaciones para las inhibiciones de tipo competitivo y no competitivo, ya que éstas son las reportadas para las iLDH de bacterias (Kohn y Kaback, 1973; Markwell y Lascelles, 1978). Los valores cinéticos K_s y V_m fueron similares en los tres; sin embargo, fue en el ajuste de tipo competitivo donde el valor de K_i fue muy semejante a los encontrados tanto en el gráfico de Dixon como en los regráficos del doble recíproco. El tipo de inhibición mixto lo descartamos ya que el valor de α calculado por regresión lineal fue siempre muy variable entre los experimentos.

La manera de discernir el tipo de inhibición del oxalato fue similar al del oxamato. Este compuesto se ha reportado como inhibidor competitivo y no competitivo en las iLDH de bacterias (Kohn y Kaback, 1973; Markwell y Lascelles, 1978) y mixto en levaduras (Gondry y Lederer, 1996). Los gráficos de Dixon mostraron una inhibición con una K_i menor para la actividad de D-iLDH con respecto a la obtenida para la L-iLDH ($K_{ic} = 0.36 \pm 0.07$ y $K_{ic} = 0.15 \pm 0.02$ para la deshidrogenación de L- y D-lactato). Esto sugiere la presencia de iLDH estereo-específicas. De tratarse sólo de un tipo de enzima, el oxalato inhibiría con una K_i igual no

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

importando el sustrato ya que la afinidad de las iLDH por su sustrato es prácticamente la misma. Los gráficos de dobles recíprocos mostraron un tipo de inhibición mixta. Se hicieron los regráficos utilizando las pendientes $(K_s/V_m)_{ap}$ y las ordenadas al origen $(1/V_m)_{ap}$ contra la concentración de inhibidor como otra forma de calcular K_i . Los valores calculados así, son acordes dentro del error experimental, con los calculados a partir de los gráficos de Dixon. Para confirmar el tipo de inhibición del oxalato, se realizaron ajustes de tipo no lineal editando las ecuaciones para los tres tipos de inhibición ya mencionados. Los ajustes mostraron que el oxalato es un inhibidor de tipo mixto. No obstante, los valores de K_i y la dispersión de los datos (χ^2) calculados por el programa de cómputo muestran semejanzas para éste tipo de inhibición y el no competitivo.

Los valores de α calculados tanto en los dobles recíprocos como en la regresión no lineal son muy semejantes dentro del error experimental, por lo que se sugiere que el oxalato inhibe de forma mixta a las iLDH de *E. gracilis*, como lo hace con las L-iLDH de algunas levaduras. No obstante, a diferencia de las enzimas de *E. gracilis*, la L-iLDH de levaduras es una L-lactato-citocromo b_2 oxido-reductasa, además de que se encuentra en el espacio intermembranal de la mitocondria (Chapman y Reid, 1991; Sinclair y col, 1998).

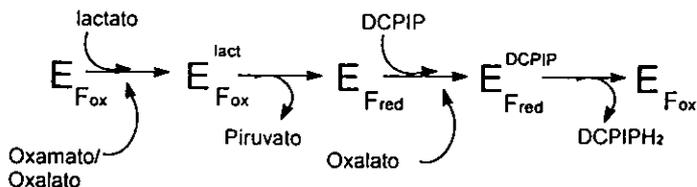
La actividad con L-lactato disminuyó rápidamente a partir de los 55°C, mientras que la actividad con D-lactato permaneció sin cambios hasta los 80°C aproximadamente. Las k_{inac} para la D-iLDH son incluso menores que la 3-fosfoglicerato cinasa de *Thermoanaerobacter* sp. Rt8.G4, una bacteria termófila (Thomas and Scopes, 1998), hecho

sorprendente ya que la temperatura de crecimiento de *E. gracilis* en nuestras condiciones es 25°C. La D-iLDH de *E. coli* se ha reportado que también es resistente a altas temperaturas (Pratt y col, 1979). La energía de activación de la desnaturalización de la L-iLDH (44 Kcal/mol) es menor a la que se requiere para desnaturalizar a la actividad con D-lactato (55.7 Kcal/mol), hecho que confirma la existencia de enzimas estereo-específicas y desecha la idea de que las mitocondrias de *E. gracilis* oxidan al L- y D-lactato por medio de un solo tipo de iLDH siendo la D-iLDH la más resistente.

Cuando nosotros incubamos a las mitocondrias en presencia de ligandos para obtener las k_{inac} y las graficamos contra la temperatura a las cuales se obtuvieron, observamos que el ligando que más confería protección además del sustrato mismo, era el isómero opuesto (Figura 13). Este dato sugería que los dos isómeros se estaban pegando a la misma enzima, pero faltaba saber si esta unión era catalíticamente productiva. La incubación de las mitocondrias de *E. gracilis* a 70°C durante 100-120s mostraron que hubo muy poca deshidrogenación del L-lactato y que la actividad de la D-iLDH no se afectó. Los parámetros cinéticos de la D-iLDH en estas mitocondrias fueron aparentemente menores que los obtenidos en las mitocondrias intactas, sin embargo éstas diferencias no fueron estadísticamente significativas, lo que nos hace suponer que aunque el L-lactato se pegue a la D-iLDH (Figura 13), éste lo hace con tan baja afinidad al sitio catalítico y es deshidrogenado con tan poca eficiencia, que no impide la deshidrogenación del D-lactato. Contrario a lo reportado en la literatura la K_s que se estimó para el L-lactato en las mitocondrias incubadas a 70°C es baja, cuando se esperaría que la afinidad por el isómero opuesto fuera

mucho menor, como se ha reportado para la D-iLDH de *E. coli* y *N. gonorrhoeae* (Futai, 1973; Kohn y Kaback, 1973; Garvie, 1980; Fischer y col, 1984), las cuales toman otros sustratos pero con valores de K_m muy altos en comparación a los de su sustrato. Sin embargo, esto no afectó su capacidad de ser utilizado como sustrato como se discutió previamente.

Los parámetros cinéticos de la D-iLDH en las mitocondrias incubadas no fueron estadísticamente diferentes a los encontrados en las mitocondrias intactas. Sin embargo, la V_m y la afinidad (K_s) tendieron a aumentar. Este fenómeno puede deberse a un cambio en la fluidez de las membranas que es donde se encuentran las iLDH de *E. gracilis*, haciendo más disponible el sitio catalítico de la enzima provocando un mayor actividad y una mayor unión a su sustrato. En el esquema 1 se presenta un modelo propuesto para explicar el ciclo catalítico de las iLDH de *E. gracilis*, el cual es semejante al ciclo catalítico de las iLDH (flavocitocromos) descritos en levaduras (Gondry y Lederer, 1996; Daff y col, 1996; Illias y col, 1998). El oxamato, como inhibidor competitivo, se une a la enzima libre, interrumpiendo la unión del lactato con la enzima. El oxalato, como inhibidor tipo mixto, puede unirse antes y después que el lactato cuando la enzima está reducida, afectando la afinidad por el sustrato y la velocidad catalítica. Se propone que el cofactor es una flavina, ya que todas las iLDH's presentan a esta molécula como cofactor, ya sea FMN para las L-iLDH o FAD para las D-iLDH.



Esquema 1. Mecanismo de reacción cinético propuesto para las isoenzimas iLDH mitocondriales de *E. gracilis*. La flavina como grupo prostético está representada como F_{ox} y F_{red} , en sus formas oxidadas y reducidas respectivamente.

Se han publicado varios reportes acerca de la solubilización de las iLDH en bacterias con diversos detergentes (Markwell y Lascelles, 1978; Allison y col, 1985b; Erwin y Gotschlich, 1993; Zboril y Wernerová, 1996). La D-iLDH de *E. coli* es la más estudiada y se ha logrado solubilizar en Tritón X-100 al igual que la L- y D-iLDH de *N. gonorrhoeae* (Fischer y col, 1994), incluso se ha reportado una activación de la enzima por este detergente (Futai, 1973; Allison y col, 1985; Ho y col, 1989).

En los primeros intentos por enriquecer la actividad de las enzimas mitocondriales de *E. gracilis*, se utilizaron diversos detergentes; la D-iLDH siempre se solubilizó, aunque preferentemente en CHAPS. La L-iLDH se extrae en octilglucósido aunque se pierde mucha actividad durante su solubilización, lo cual la asemeja a la L-iLDH de *A. calcoaceticus* (Allison y col, 1985) en donde la L-iLDH también fue muy lábil en el proceso de purificación.

Las lactato deshidrogenasas conectadas a la cadena respiratoria de la mitocondria, que utilizan preferentemente lactato como sustrato, pueden tener una participación clave en el metabolismo de *E. gracilis*. Como se muestra en el esquema 2, la carencia de una piruvato deshidrogenasa podría representar un problema para *E. gracilis* en su obtención de

energía. Este problema se elimina teniendo a las iLDH, quienes ceden sus electrones directamente a la cadena respiratoria para la síntesis de ATP, pudiendo así el piruvato utilizarse como esqueleto carbonado hacia la gluconeogénesis o de sustrato para la enzima málica para la producción de malato (Buctow, 1989).

De importancia también es que las iLDH de *E. gracilis*, forman parte de otras dos vías presentes en estas mitocondrias: la vía resistente a antimicina y otra vía resistente a cianuro y que también se encuentra en plantas.

En cuanto a la participación fisiológica de la D-iLDH, en las células que se cultivaron en medio de glutamato y malato sólo se detectó L-lactato intracelularmente (Moreno-Sánchez y col., 2000), por lo que la actividad de D-iLDH podría ser otra enzima que utiliza al D-lactato como otro sustrato. Se han reportado actividades de glicolato y glioxilato deshidrogenasa en las mitocondrias de *E. gracilis*, estas enzimas, por la semejanza estructural de su sustrato con el D-lactato, podrían estar involucradas con la deshidrogenación del D-lactato. Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales las mitocondrias de *E. gracilis* prácticamente no oxidaban al glioxilato ni al glicolato y concentraciones de 10 mM de estos sustratos no inhibieron las actividades de D-iLDH. Tal vez en un medio de cultivo con una mezcla de L- y D-lactato como fuente de carbono, el isómero D alcance concentraciones detectables y allí se podría explorar si la D-iLDH en realidad tiene una actividad relevante en la utilización de éste metabolito ó si su acción sobre éste sólo sea una más de sus actividades fisiológicas.

CONCLUSIONES.

Las mitocondrias de *E. gracilis* oxidan al L- y D-lactato por medio de enzimas estereo específicas: la termodinámica de la disociación del complejo enzima-substrato y la inactivación térmica son diferentes en ambas enzimas, las enzimas son inhibidas por los inhibidores clásicos de las iLDH aunque con diferente K_i para cada enzima. De manera semejante, ambas enzimas reducen quinonas y tienen mecanismo cinético de tipo ping-pong. A excepción del mecanismo cinético de reacción, que se desconoce en las enzimas bacterianas, las iLDH de *E. gracilis* serían semejantes a las bacterias.

A diferencia de las bacterias que carecen de organelos celulares, las iLDH de *E. gracilis* se localizan en la cara externa de la membrana mitocondrial interna.

Perspectivas.

Otros aspectos importantes acerca de estas enzimas que no se han investigado, son:

- (a) La naturaleza del cofactor. En todos los sistemas en donde se han reportado iLDH's, las L-iLDH tienen como cofactor FMN y las D-iLDH tiene FAD, por lo que es importante conocerlos y explorar si están unidos de forma covalente a la enzima.
- (b) La naturaleza de los aceptores de electrones de la L-iLDH y la D-iLDH. En experimentos realizados en nuestro laboratorio con mitocondrias alimentadas con lactato, el complejo bc_1 y el componente resistente a antimicina oxidan al decilbenzoquinol y al duroquinol respectivamente. Las formas oxidadas son sustratos pobres de la L- y D-iLDH. Estos datos sugieren que la iLDH y el complejo bc_1 tienen una afinidad diferente por quinonas. Por lo que en las mitocondrias de *E. gracilis* las quinonas Q9 y la rodoquinona-9 pueden ser ambas sustratos de las enzimas en condiciones energéticas diferentes, con una diferente afinidad para ceder los electrones al bc_1 , al componente resistente a antimicina o a la oxidasa terminal.
- (c) Otra pregunta es acerca de la participación de las iLDH's en el metabolismo de *E. gracilis* cuando éstas son cultivadas en presencia o en ausencia de lactato. Dado que las enzimas se expresan a pesar de que las células se cultivan en un medio con glutamato y malato como fuente de carbono, su participación puede no ser de relevancia al inicio del cultivo, sino cuando las reservas de paramilo (glucosa con enlace β -1,3) han empezado a utilizarse.

d) Otra pregunta es si la D-iLDH tiene una función fisiológica en *E. gracilis*, ya que aunque ambas enzimas están presentes en células cultivadas en glutamato y malato, sólo se ha detectado la presencia de L-lactato dentro de la célula.

Bibliografía.

- Ahmed, S. A. and Claiborne, A. (1992). Catalytic properties of streptococcal NADH oxidase containing artificial flavins. *J. Biol. Chem.* **267**,25822-25829.
- Allison, N., O'Donnell, M. J. and Fewson, C. A. (1985a) Membrane-bound lactate and mandelate dehydrogenases of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Biochem. J.* **231**,407-416.
- Allison, N. O'Donnell M. J., Hoey, M. E. and Fewson C. A. (1985b). Membrane-bound lactate dehydrogenases and mandelate dehydrogenases of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Biochem. J.* **227**,753-757.
- Barnes E. M., and Kaback H. R. (1970). β -galactoside transport in bacterial membrane preparations: Energy coupling via membrane-bound D-Lactic dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **66**,1190-1198.
- Brodersen J., Baumer S., Abken H. J., Gottschalk G. and Deppenmeier U. (1999). Inhibition of membrane-bound electron transport of the methanogenic archeon *Methanosarcina mazei* Gö1 by diphenyleneiodonium. *Eur. J. Biochem.* **259**,218-224.
- Brooks, G. A., Dubouchaud, H., Brown, M., Sicurello, J. P. and Butz, C. E. (1999). Role of mitochondrial lactate dehydrogenase and lactate oxidation in the intracellular lactate shuttle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**,1129-34.
- Buetow D. E. (1989). *The mitochondrion in: The Biology of the Euglena.* Academic Press Inc.,USA, Vol IV, pp 247-314.
- Campbell, H. D., Rogers, B. L. and Young, I. G. (1984). Nucleotide sequence of the respiratory D-Lactate dehydrogenase gene of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **144**,367-373.
- Black, M. T., White, S. A., Reid, G. A. and Chapman, S. K. (1989). High-level expression of fully active yeast flavocytochrome b2 in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **258**,255-9
- Chávez, E., Bravo, C., and Jay, D. (1985). On the role of K⁺ on succinic dehydrogenase activity. *J. Bioenerg. Biomembr.* **18**,93-99.
- Covian García Raúl Miguel. (1999). Purificación y caracterización del complejo bc₁ de mitocondrias de *E. gracilis*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Daff, S., Ingledew, W. J., Reid, G. A. and Chapman, S. K. (1996). New Insights into the Catalytic Cycle of Flavocytochrome b₂. *Biochem.* **35**,6345-6350.
- de Gier J-W. L., Lübben M., Reijnders W. N. M., Tipker C. A., Slotboom, D-J., van Spanning, R. J. M., Stouthamer, A. H. and van der Oost, J. (1994). The terminal oxidases of *Paracoccus denitrificans*.

Mol. Microbiol. 13,183-196.

- Devars, S., Torres-Márquez, M.E., González-Halphen, D., Uribe, A and Moreno-Sánchez, R. (1992). Cyanide-sensitive and cyanide-resistant respiration of dark-grown *Euglena gracilis*. Plant Sci. 82:37-46.
- Devars, S., Hernández, R., Covián, R., García-Horsman, A., Barquera, B., and Moreno-Sánchez R. (1998). The content of alternative oxidase of *Euglena* mitochondria is increased by growth in the presence of cyanide and is not cytochrome *c*. J. Euk. Microbiol. 45,122-130
- Diez-Gonzalez, F., Russell, J. B. and Hunter, J. B. (1997). NAD-independent Lactate and butyryl-CoA dehydrogenases of *Clostridium acetobutylicum* P262. Curr. Microbiol. 34,162-166.
- Erwin, A. L. and E. C. Gotschlich. (1996). Cloning of a *Neisseria meningitidis* gene for L-Lactate dehydrogenase (L-LDH): Evidence for a second meningococcal L-LDH with different regulation. J. Bacteriol. 178,4807-4813.
- Erwin, A. L. and E. C. Gotschlich. (1993). Oxidation of D-Lactate and L-Lactate by *Neisseria meningitidis*: Purification and cloning of meningococcal D-Lactate dehydrogenase. J. Bacteriol. 175,6382-6391.
- Fewson, C. A., Baker, D. P., Chalmers, R. M., Keen, J. N., Hamilton, I. D., Scott, A. J. and Yasin M. (1993). Relationship amongst some bacterial and yeast lactate and mandelate dehydrogenases. J. Gen. Microbiol. 139,1345-1352.
- Fischer R. S., Martin G. C., Rao P. and Jensen R. A. (1994). *Neisseria gonorrhoeae* possesses two nicotinamide adenine dinucleotide-independent lactate dehydrogenases. FEMS Microbiol. 115,39-44.
- Fung, L., W-M., Pratt, E. A. and Ho, C. (1979). Biochemical and biophysical studies on the interaction of a membrane-bound enzyme, D-lactate dehydrogenase from *Escherichia coli*, with phospholipids. Biochem. 18,317-324.
- Futai, M. (1973). Membrane D-Lactate dehydrogenase from *Escherichia coli*. Purification and properties. Biochem. 12,2468-2474.
- Garvie, E. I. (1980). Bacterial Lactate dehydrogenases. Microbiol. Rev. 44,106-139.
- Gennis, R. B. (1991). Some recent advances relating to prokariotic cytochrome *c* reductases and cytochrome *c* oxidases. Biochim. Biophys. A. 1058,21-24.
- Gennis, R. B., Barquera, B., Hacker, B., Van Doren, S. R., Arnaud, S., Crofts, A. R., Davidson, E., Gray, K. A. and Daldal, F. (1993). The bc₁ complexes of *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodobacter capsulatus*. J. Bioenerg. Biomembr. 25,195-209.
- Gilmour M., Harry J. Flint and Wilfrid J. Mitchell. (1994). Multiple lactate dehydrogenase activities of the rumen bacterium *Selenomonas ruminantium*. Microbiol. 140,2077-2084.

- Gondry, M. and Lederer, F. (1996). Functional properties of the Histidine-Aspartate ion pair of flavocytochrome b_2 (L-Lactate dehydrogenase): Substitution of Asp282 with asparagine. *Biochem.* 35,8587-8594.
- Hallenbeck, P. C. and Gennaro, G. (1998). Stopped-flow kinetic studies of low potential electron carriers of the photosynthetic bacterium, *Rhodobacter capsulatus*: ferredoxin Y and NifF. *Biochim. Biophys. A.* 1365,435-442.
- Haugaard, N. (1959). D- and L-Lactic acid oxidases of *E. coli*. *Biochim. Biophys. A.* 31,66-72.
- Hellwig P, Grzybek S, Behr J, Ludwig B, Michel H and Mantele W. (1999). Electrochemical and ultraviolet/visible/infrared spectroscopic analysis of heme a and a3 redox reactions in the cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*: separation of heme a and a3 contributions and Assignment of vibrational modes. *Biochem.* 38,1685-1694.
- Ho, C., Pratt E. A. and Rule G. S. (1989). Membrane-bound D-Lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*: a model for protein interactions in membranes. *Biochem. Biophys. A.* 988,173-184.
- Hoey, M. E., Allison, N., Scott, A. J. And Fewson, C. A. (1987). Purification and properties of L-mandelate dehydrogenase and comparison with other membrane-bound dehydrogenases from *Acinetobacter calcoaceticus*. *Biochem. J.* 248, 871-876.
- Illias, R. M., Sinclair, R., Robertson, D., Neu, A., Chapman, S. K. and Reid, G. A. (1998). L-Mandelate dehydrogenase from *Rhodotorula graminis*: cloning, sequencing and kinetic characterization of the recombinant enzyme and its independently expressed flavin domain. *Biochem. J.* 333,107-115.
- Ingledew, W. J. and Poole R. K. (1984). The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 48,222-271.
- Inui, H. (1984). Occurrence of oxygen-sensitive, NADP⁺-dependent pyruvate dehydrogenase in mitochondria of *Euglena gracilis*. *J. Biochem.* 96,931-934.
- Kaback H. R. and Milner L. S. (1970). Relationship of a membrane-bound D-(-)-Lactic dehydrogenase to amino acid transport in isolated bacterial membrane preparations. *Biochem.* 66,1008-1015.
- Kilpatrick, L. and Erecinska, M. (1977). Mitochondrial respiratory chain of *Tetrahymena pyriformis*: the properties of submitochondrial particles and the soluble b and c type pigments. *Biochim. Biophys. A.* 462,515-530.
- Kohn, L. D. and Kaback, H. R. (1973). Mechanisms of active transport in isolated bacterial membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 248,7012-7017.
- Korotkov, S. M., Skulskii, Y. A. and Glazunov, V. V. (1998). Cd²⁺

- effects on respiration and swelling of rat liver mitochondria were modified by monovalent cations. *J. Inorg. Biochem.* 70,17-23.
- Kovatchev S., Vaz Winchill L. C. and Eibl H. (1981). Lipid dependence of the membrane-bound D-Lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 256,10369-10374.
 - Kumar, S. and Acharya, S. K. (1999). 2,6-Dichloro-phenol Indophenol prevents switch-over of electrons between the cyanide-sensitive and -insensitive pathway of the mitochondrial electron transport chain in the presence of Inhibitors. *Anal. Biochem.* 268,89-93.
 - Lehninger, A. *Principles of biochemistry.* (1993). Second edition. Worth Publishers Inc. pp 353, 542-597.
 - Link, T. A. Hasse, U., brandt, U. and Jagow, G. V. (1993). What information do inhibitors provide about the structure of the hydroquinone oxidation site of ubihydroquinone: cytochrome c oxidoreductase? *J. Bioenerg. Biomem.* 25,221-232.
 - Linton, E. W., Hittner, D., Auld, T. and Triemer R. E. (1999). A molecular study of euglenoid phylogeny using small subunit rDNA. *J. Euk. Microbiol.* 46,217-223.
 - Liu, H. Y. and Germanas, J. P. (1998). NMR spectroscopic studies of the hydrogenosomal [2Fe-2S] ferredoxin from *Trichomonas vaginalis*: Hyperfine-shifted ¹H resonances. *J. Inorg. Biochem.* 72,127-131.
 - Lodi, T. and Ferrero, Y. (1993). Isolation of the DLD gene *Saccharomyces cerevisiae* encoding the mitochondrial enzyme D-Lactate ferricytochrome c oxidoreductase. *Mol. Gen. Genet.* 238,315-324.
 - Long, G. L. and Kaplan, N. O. (1968). D-Lactate specific pyridin nucleotide lactate dehydrogenase in animals. *Science* 162,685-686.
 - Lord, J. M. and Merret, M. J. (1971). The intracellular localization of glicollate oxidoreductase in *Euglena gracilis*. *Biochem. J.* 124,275-281.
 - Macheroux, P., Hill, S., Austin, S., Eydmann, T., Jones, T., Kim, S.O., Poole, R. and Dixon, R. (1998). Electron donation to the flavoprotein NifL, a redox-sensing transcriptional regulator. *Biochem. J.* 332,413-419.
 - Markwell J. P. and Lascelles J. (1978). Membrane-bound, pyridine nucleotide-independent L-Lactate dehydrogenase of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 133,593-600.
 - Moreno-Sánchez, R. y Raya, J. C. (1987). Preparation of coupled mitochondria from *Euglena* by sonication. *Plant Sci.* 48,151-157.
 - Moreno-Sanchez R., Covian, R., Jasso-Chavez, R., Rodriguez-Enriquez S., Pacheco-Moises F. and Torres-Marquez M.E. (2000). Oxidative phosphorylation supported by an alternative respiratory pathway in mitochondria from *Euglena*. *Biochim. Biophys. A.* 21,200-210.

- Morris, C. J., Black, A. C., Pealing, S.L., Manson, D. C. F., Chapman, S. K., Reid, G. A., Gibson, D. M. and Ward, F. B. (1994). Purification and properties of anovel cytochrome: flavocytochrome c from *Shewenella putrefaciens*. *Biochem. J.* 302,587-593.
- Müh, U., Williams Jr., C. H. and Massey V. (1994). Lactate monooxygenase. Site directed mutagenesis of the postulated active site base histidine 290. *J. Biol. Chem.* 269,7989-7993.
- Müller, M. and Martin, W. (1999). The genome of *Rickettsia prowazekii* and some thoughts on the origin of mitochondria and hydrogenosomes. *BioEssays* 21,377-381.
- Myllykallio, H., Drepper, F., Mathis, P. And Daldal, F. (1998). Membrane-anchored cytochrome c_y mediated microsecond time range electron transfer from cytochrome bc_1 complex to the reaction center in *Rhodobacter capsulatus*. *Biochem.* 37,5501-5510.
- Nordnes, S., Kraus, S., and Johansen, T. (1994). cDNA sequence of zebrafish (*Brachydanio rerio*) translation elongation factor-1 α : molecular phylogeny of eukaryotes based on elongation factor-1 α protein sequences. *Biochem. Biophys. A.* 1219,529-532.
- Olson, S. T. and Massey V. (1979). Purification and properties of the flavoenzyme D-lactate dehydrogenase from *Megasphaera elsdenii*. *Biochem.* 18,4714-4724.
- Pallotta, M. L., Fratianni, A. and Passarella, S. (1999). Metabolite transport in isolated yeast mitochondria: fumarate/malate and succinate/malate antiports. *FEBS Lett.* 462,313-316.
- Palmer J. D. and Delwiche, C. F. (1996). Second-hand chloroplasts and the case of the disappearing nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93,7432-7435.
- Peermans, D. B., Pratt, E. A., Truong, H-T. N., Chien Ho, and Rule G. S. (1991). Site specific incorporation of 5-Fluorotryptophan as a probe of the structure and function of the membrane-bound D-Lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*: A ^{19}F Nuclear magnetic resonance study. *Biochem.* 29,3256-3262.
- Philip J. (1987). *Paracoccus* as a free-living mitochondrion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 24,140-149.
- Pieuille, L., Guigliarelli, B., Asso, M., Dole, F., Bernadac, A. and Hatchikian, E. C. (1995). Isolation and characterization of the pyruvate-ferredoxin oxidoreductase from the sulfate-reducing *Desulfovibrio africanus*. *Biochim. Biophys. A.* 1250,49-59.
- Poole, R. C., Halestrap, A. P., Price, S. J. and Levi, A. J. (1989). The kinetics of transport of lactate and piruvate into isolated cardiac myocytes from guinea pig. *Biochem. J.* 264,409-418.
- Pratt E. A., Fung L. W. M., and Ho C. (1979). Membrane-bound D-Lactate dehydrogenase from *Escherichia coli*: purification and properties.

Biochem. 18,312-316.

- Price C. A. (1961). A zinc-dependent Lactate dehydrogenase in *Euglena gracilis*. Biochem. J. 82,61-66.
- Saeki, K., Jain, M. K., Shen, G-J., Prince, R. C. and Zeikus, J. G. (1989). Purification and properties of ferredoxin and rubredoxin from *Butyrubacterium methylophilicum*. J. Bacteriol. 171,4736-4741.
- Segel, Y. H. (1975). *Enzyme kinetics*, John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Shigeoka, S., Onishi, T., Maeda, K. and Nakano, Y. (1985). Characterization and molecular properties of 2-oxoglutarate decarboxylase from *Euglena gracilis*. Arch. Biochem. Biophys. 288,22-28.
- Short, S. A., Kaback, H. R. and Kohn, L. D. (1974). D-Lactate dehydrogenase binding in *Escherichia coli* dld⁻ membrane vesicles reconstituted for active transport. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71,1461-1465.
- Silva, M. A. P., Moreau, F., Zachowski, A., Mesneau, A. and Roussaux, J. (1999). Purification and characterization of phosphate carrier from potato mitochondria. Plant Sci. 143,27-33.
- Sinclair, R., Reid, G. A. and Chapman S. (1998). Re-design of *Saccharomyces cerevisiae* flavocytochrome b₂: Induction of L-mandela dehydrogenase activity. Biochem. J. 333,117-120.
- Sled, V. D., Rudnitzki, N. Y., Hatefi, Y., and Ohnishi, T. (1994). Thermodynamic analysis of the flavin in mitochondrial NADH: Ubiquinone oxidoreductase (Complex I). Biochem. 33,10069-10075.
- Short S. A. and Kaback H. R. (1975). Localization of D-Lactate dehydrogenase in native and reconstituted *Escherichia coli* membrane vesicles. J. Biol. Chem. 250,4291-4296.
- Sun, Z-Y., Truong, H-T. N., Pratt, E. A., Sutherland, D.C., Kulig, C.E., Homer, R. J., Groetsch, S. F., Hsue, P. Y. and Ho, C. (1993). A ¹⁹F-NMR study of the membrane-binding region of D-lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*. Prot. Sci. 2,1938-1947.
- Taguchi, H. and Ohta, T. (1991) D-Lactate dehydrogenase is a member of the D-isomer-specific 2-hydroxyacid dehydrogenase family. J. Biol. Chem. 266,12588-12594.
- Taylor, B. L. and Zhulin, I. B. (1998). In search of higher energy: metabolism-dependent behaviour in bacteria. Mol. Microbiol. 28,683-690.
- Tegoni, M., Guigliarelli, B., Asso, M., Brunori, M. and Bertrand, P. (1998). Temperature-jump and potentiometric studies on recombinant wild type and Y143F and Y254F mutants of *Saccharomyces cerevisiae* flavocytochrome b₂: role of the driving force in intramolecular electron transfer kinetics. Biochem. 37,12761-12771.

- Tessier, L. H., Speck, H. V.D., Gualberto, J. M. and Grienenberger. (1997). The *coxI* gene from *Euglena gracilis*: a protist mitochondrial gene without introns and genetic code modifications. *Curr. Genet.* 31,208-213.
- Thomas, T. M. and Scopes, R. K. (1998). The effects of temperature on the kinetics and stability of mesophilic and thermophilic 3-phosphoglycerate kinases. *Biochem. J.* 330,1087-1095.
- Tielens, A. G. M. and Van Hellemond, J. J. (1998). The electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. *Biochim. Biophys. A.* 1365,71-78.
- Uden, G. and Bongaerts, J. (1997). Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim. Biophys. A.* 1320,217-234.
- Uribe, Aida. (1998). Localización y caracterización cinética de la Lactato deshidrogenasa de *Euglena gracilis*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Uribe, A. and Moreno-Sánchez, R. (1992). Energy-dependent reactions supported by several substrates in coupled *Euglena gracilis* mitochondria. *Plant Sci.* 86,21-32.
- Venturoli G, Drepper F, Williams JC, Allen JP, Lin X. and Mathis P. (1998). Effects of temperature and ΔG° on electron transfer from cytochrome c_2 to the photosynthetic reaction center of the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Biophys. J.* 74,3226-40
- Volokita, M. and Somerville, C. R. (1987). The primary structure of spinach glycolate oxidase deduced from the DNA sequence of cDNA clone. *J. Biol. Chem.* 262,15825-15828.
- Wanders, R. J. A. (1985). Quantitative studies on control of flux in respiration, ammoniogenesis and ammonia utilization in rat-liver mitochondria. *Academisch Proefschrift Geboren te Amsterdam. Universiteit van Amsterdam.*
- Yagi, T., Yano, T. and Matsuno-Yagi, A. (1993). Characteristics of the energy-transducing NADH-quinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans* as revealed by biochemical, biophysical, and molecular biological approaches. *J. Bioenerg. Biomem.* 25,339-345.
- Yang, S.S., Lee, J. S., Kim, Y. M., and Kim, S. W. (1998). Sequence of electron carriers in the process of methanol oxidation by a new obligate methylotrophic bacterium. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 46,807-819.
- Yasuhira, S. and Simpson L. (1997). Phylogenetic affinity of mitochondria of *Euglena gracilis* and kinetoplastids using cytochrome oxidase I and hsp60. *J. Mol. Biol.* 44,341-347.
- Yokota, A. and Kitaoka S. (1979). Occurrence of glycolate dehydrogenase in mitochondria and microsomes in streptomycin-bleached mutant of *Euglena gracilis* Z. *Agric. Biol. Chem.* 43,855-857.

- Yokota, A. and Kitaoka, S. (1980). Occurrence and subcellular distribution of enzymes involved in the glycolate pathway and their physiological function in a bleached mutant of *Euglena gracilis* Z. Agric. Biol. Chem. 45,15-22.
- Zboril, P. and Wernerová, V. (1996). The isolation and some properties of the membrane-bound lactate dehydrogenase of *Paracoccus denitrificans*. Biochem. Mol. Biol. Int. 39,595-605.